

RNA Edierung als molekulare Ursache für Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität



DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Peter Poltnigg
aus Augsburg

Marburg/Lahn 2006

Vom Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter:

Zweitgutachter:

Tag der mündlichen Prüfung am:

08. November 2006

Prof. Dr. Uwe G. Maier

Prof. Dr. Klaus Lingelbach

30. November 2006

Meiner Familie und Freunden

Teile dieser Arbeit sind publiziert in:

Tillich M, Poltnigg P, Kushnir S, Schmitz-Linneweber C. Maintenance of plastid RNA editing activities independently of their target sites. EMBO Rep. 2006 Mar; 7(3):308-13 (geteilte Erstautorenschaft)

und

Schmitz-Linneweber C, Kushnir S, Babiychuk E, Poltnigg P, Herrmann RG, Maier RM. Pigment deficiency in nightshade/tobacco cybrids is caused by the failure to edit the plastid ATPase alpha-subunit mRNA. Plant Cell. 2005 Jun; 17(6):1815-28

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	1
II.	Abbildungsverzeichnis	4
III.	Tabellenverzeichnis.....	4
IV.	Abkürzungen	5
1.	Einleitung.....	6
1.1	Die Plastide	6
1.1.1	Von der Endosymbiose zur Pflanzenzelle	6
1.1.2	Das Plastidenchromosom	8
1.1.3	Die plastidäre Genexpression	9
1.1.3.1	Plastidäre Transkription	10
1.1.3.2	Plastidäre RNA Edierung	12
1.1.3.2.1	Charakteristika plastidärer RNA Edierung	13
1.1.3.2.2	Mechanistik plastidärer RNA Edierung	14
1.1.3.2.3	Faktoren plastidärer RNA Edierung	15
1.1.3.2.4	Evolution plastidärer Edierungsstellen	19
1.2	Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität	21
1.2.1	Determinanten von Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität	22
1.2.2	[<i>Atropa belladonna</i> (<i>Nicotiana tabacum</i>)]-Cybriden als Modell für Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität	24
1.3	Zielsetzung	25
2.	Material und Methoden.....	28
2.1	Material	28
2.1.1	Chemikalien und nicht anderweitig spezifizierte Verbrauchsmittel	28
2.1.2	Enzyme	29
2.1.3	Antibiotika	30
2.1.4	Nukleinsäureaufreinigung	30
2.1.5	Filter und Membranen	30
2.1.6	Oligonukleotide.....	30
2.1.7	DNA- und RNA-Längenstandards sowie Protein-Molekulargewicht-Standards	33
2.1.8	Geräte	34
2.1.9	Software	34
2.1.10	Vektoren	34
2.1.11	Bakterienstämme	34
2.1.12	Pflanzenmaterial.....	35
2.2	Methoden.....	35
2.2.1	Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren	35
2.2.1.1	Plasmidpräparation	35
2.2.1.2	DNA-Isolierung aus Pflanzengewebe	35
2.2.1.3	RNA-Isolierung aus Pflanzengewebe	36
2.2.1.4	RNA-Isolierung aus Polysomenfraktionen	36
2.2.1.5	Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	38
2.2.1.5.1	Organische Lösungsmittel	38
2.2.1.5.1.1	Phenolextraktion.....	38
2.2.1.5.1.2	Chloroformextraktion	38
2.2.1.5.2	Fällung von Nukleinsäuren	39
2.2.1.5.2.1	Natriumacetatfällung.....	39
2.2.1.5.2.2	Ammoniumacetatfällung.....	39
2.2.1.5.3	DNA-Aufreinigung mit nukleinsäurebindenden Säulen	39
2.2.1.5.4	DNA-Eluierung aus Agarosegelen.....	40
2.2.1.6	Elektrophorese-, Transfer- und Nachweistechiken von Nukleinsäuren.....	40
2.2.1.6.1	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	40
2.2.1.6.2	DNA-Transfer auf Nylonmembranen („Southern-Blot“).....	40
2.2.1.6.3	RNA-Agarose-Gelelektrophorese	41
2.2.1.6.4	RNA-Transfer auf Nylonmembranen („Northern-Blot“).....	42
2.2.1.6.5	Herstellung radioaktiver strangspezifischer RNA-Sonden mittels <i>in vitro</i> -Transkription	42
2.2.1.6.6	Herstellung nicht-radioaktiver DNA-Doppelstrangsonden mittels PCR.....	43

2.2.1.6.7	Sondenhybridisierung und Detektion auf DNA- oder RNA-Membranen	43
2.2.1.6.7.1	Hybridisierung und Detektion radioaktiver strangspezifischer RNA-Sonden	43
2.2.1.6.7.2	Hybridisierung und Detektion nicht-radioaktiver DNA-Doppelstrangsonden	44
2.2.1.7	Amplifikation und enzymatische Modifizierung von Nukleinsäuren	45
2.2.1.7.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	45
2.2.1.7.2	Enzymatische Hydrolyse von DNA mittels DNase I	46
2.2.1.7.3	cDNA-Synthese	46
2.2.1.7.3.1	Gesamt-cDNA: reverse Transkription mit Zufallshexaoligonukleotiden	46
2.2.1.7.3.2	cDNA mit genspezifischen Primern	47
2.2.1.7.4	Restriktionsanalyse	47
2.2.1.7.5	Umwandlung kohäsiver in glatte Enden von DNA-Fragmenten	47
2.2.1.7.6	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	48
2.2.1.7.7	Ligation	48
2.2.1.7.8	Klonierung von PCR-Produkten	48
2.2.1.7.9	Automatische DNA-Sequenzierung nach Sanger <i>et al.</i> (1977)	49
2.2.2	Methoden zur Analyse von Proteinen	50
2.2.2.1	Proteinextraktion und Mengenbestimmung	50
2.2.2.1.1	Extraktion und Fraktionierung von Gesamtprotein aus Blattgewebe	50
2.2.2.1.2	Mengenabschätzung extrahierter Proteine	51
2.2.2.1.2.1	Proteinkonzentrationsbestimmung anhand der Chlorophyllkonzentration nach Arnon (1949)	51
2.2.2.1.2.2	Relative Proteinkonzentrationsbestimmung	52
2.2.2.2	Elektrophorese-, Transfer- und Nachweistechiken von Proteinen	52
2.2.2.2.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	52
2.2.2.2.2	Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen	53
2.2.2.2.3	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen nach Blum, H. <i>et al.</i> (1987)	53
2.2.2.2.4	Proteintransfer auf Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membranen („Western-Blot“)	54
2.2.2.2.5	Immunodetektion von Proteinen auf PVDF-Membranen	55
2.2.2.2.5.1	Luminol (Chemilumineszenz)	55
2.2.2.2.5.2	Alkalische Phosphatase (kolorimetrisch)	56
2.2.3	Transformationstechniken, Mutagenese und somatische Zellfusionierung	56
2.2.3.1	Transformation von <i>E. coli</i> durch $RbCl_2/CaCl_2$ und Hitzeschock	56
2.2.3.2	Plastidentransformation an isolierten Blättern nach Svab <i>et al.</i> (1990)	58
2.2.3.2.1	Beladung der Goldpartikel mit DNA	58
2.2.3.2.2	„Biolistischer“ Transfer der Goldpartikel in das Blattgewebe	59
2.2.3.2.3	Selektion transplastomischer Pflanzenlinien	59
2.2.3.2.4	Test auf Homoplastomie von transplastomischen Pflanzenlinien	60
2.2.3.3	Chemische Mutagenese somatischer Pflanzenzellen	61
2.2.3.4	Herstellung cytoplasmatischer Hybriden (Cybriden)	61
2.2.3.5	Herstellung der Glufosinat-Ammonium-resistenten <i>N. tabacum</i> Linie BarD	62
2.2.4	Pflanzengewebekultur	62
2.2.4.1	Gewebekulturmedien	62
2.2.4.2	Samensterilisierung	62
2.2.5	Elektronenmikroskopie	63
3.	Ergebnisse	64
3.1	Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität in [<i>Atropa belladonna</i> (<i>Nicotiana tabacum</i>)]-Cybriden	64
3.1.1	Analyse der Insertion/Deletion in <i>rpoC2</i>	65
3.1.1.1	Herstellung transplastomischer <i>Nicotiana tabacum</i> Linien mit <i>Atropa belladonna</i> spezifischer Deletion in <i>rpoC2</i>	66
3.1.1.2	Analyse von <i>Atropa belladonna</i> Cybriden mit in <i>rpoC2</i> modifiziertem <i>Nicotiana tabacum</i> Plastidengenom	69
3.1.2	Identifizierung von Inkompatibilitätsfaktoren	72
3.1.2.1	Analyse von Suppressormutanten	72
3.1.2.2	Analyse von Hybriden und partiellen Hybriden	76
3.1.3	Revers genetische Analyse der identifizierten Aminosäureposition 264 in <i>atpA</i>	78
3.1.3.1	Analyse transplastomischer <i>Nicotiana tabacum</i> Linien mit verändertem <i>cis</i> -Element der Edierungsstelle <i>atpA</i> -264 (mA)	78
3.1.3.2	Analyse von <i>Nicotiana tabacum</i> Linien mit einer Prolin zu Tryptophan Substitution in <i>atpA</i> -264 (WAT)	83
3.1.3.3	Analyse von Cybriden mit einem Prolin zu Leucin Austausch in <i>atpA</i> -264 im Plastom von <i>Nicotiana tabacum</i> [(Ab(Nt:CTC)]	87

3.1.4	Edierungsdefekte an nicht artspezifischen Edierungsstellen.....	94
3.1.5	Kreuzungsanalyse von <i>Nicotiana tabacum</i> und <i>Atropa belladonna</i> nach Eliminierung der Edierungsstelle <i>atpA-264</i>	97
3.2	Editotypenunterschiede innerhalb der Gattung <i>Nicotiana</i>	97
3.2.1	Der Editotyp von <i>Nicotiana glutinosa</i>	99
3.2.2	Heterologe Edierung nicht homologer Edierungsstellen.....	102
3.2.3	Unterschiedliche Edierungseffizienz an nicht-speziespezifischen Edierungsstellen	107
4.	Diskussion	109
4.1	Der albinotische Phänotyp der [Ab(Nt)]-Cybriden beruht nicht auf mitochondriellen Defekten	109
4.2	Der Einfluss von Edierungsdefekten auf die Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität in der [Ab(Nt)]-Cybride.....	110
4.2.1	Der albinotische Phänotyp der [Ab(Nt)]-Cybride beruht auf dem Edierungsdefekt in <i>atpA-264</i>	110
4.2.1.1	Die partielle Edierung von <i>atpA-264</i> hat einen negativen Effekt auf die Pflanzenentwicklung	111
4.2.1.2	Ein Leucin an Aminosäureposition 264 in CF ₁ α ist essentiell für eine normale Chloroplastendifferenzierung	113
4.2.1.3	Der Albinismus der [Ab(Nt)]-Cybride und der <i>Nicotiana tabacum</i> WAT-Mutante kann pharmakologisch phänokopiert werden	116
4.2.2	Weitere Edierungsdefekte in [Ab(Nt)]-Cybriden könnten zur Inkompatibilität beitragen....	119
4.2.3	Der Einfluss des Polymorphismus in <i>rpoC2</i> auf die Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität in der [Ab(Nt)]-Cybride	120
4.2.3.1	Die Insertion/Deletion in <i>rpoC2</i> ist nicht verantwortlich für die Pigmentdefizienz in der [Ab(Nt)]-Cybride	121
4.2.3.2	Im Kernhintergrund von <i>Atropa belladonna</i> sind die eigenen Plastideng Genome gegenüber denen aus <i>Nicotiana tabacum</i> bevorzugt	122
4.3	Bilden plastidäre Edierungsstelle und Spezifitätsfaktor eine evolutive Einheit?	123
4.3.1	Die Edierung heterologer, nicht endogener Stellen ist keine Ausnahme.....	123
4.3.2	Spezifitätsfaktoren zeigen Unterschiede in ihrer evolutionären Stabilität	124
4.4	RNA Edierung als genereller Faktor für Kern-Organellen-Inkompatibilität und postzygotische Isolation	126
4.4.1	RNA Edierung ist ein Faktor für Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität.....	127
4.4.2	Editotypenunterschiede müssen nicht zwangsläufig zu Kerngenom-Plastom- Inkompatibilität führen	128
4.4.3	Sexuelle Inkompatibilität lässt sich nicht durch Editotypenunterschiede erklären	130
4.4.4	RNA Edierung könnte in Kerngenom-Chondriom-Inkompatibilität involviert sein	130
4.5	Ist plastidäre RNA Edierung überflüssig?.....	131
5.	Zusammenfassung	134
6.	Literaturverzeichnis	136
	Danksagung	151
	Lebenslauf	152
	Publikationsliste	153
	Erklärung	154

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1:	Herstellung somatischer Hybriden und Suppressormutanten	65
Abbildung 3-2:	Transplastomische <i>N. tabacum</i> Linien und Cybriden mit <i>A. belladonna</i> spezifischer Deletion im <i>rpoC2</i> -Gen	68
Abbildung 3-3:	Edierung <i>N. tabacum</i> spezifischer Edierungsstellen in somatischen Hybriden	76
Abbildung 3-4:	Mutagenese des putativen <i>cis</i> -Elements der Edierungsstelle <i>atpA</i> -264.....	79
Abbildung 3-5:	Prolin zu Tryptophan Mutagenese in Codon 264 von <i>atpA</i>	84
Abbildung 3-6:	Eliminierung der Edierungsstelle in <i>atpA</i> -264	89
Abbildung 3-7:	Edierungsdefekt in der [Ab(Nt)]-Cybride in der nicht-artspezifischen Edierungsstelle <i>ndhG</i> -17	96
Abbildung 3-8:	Heterologe Edierung der <i>N. glutinosa</i> spezifischen Edierungsstelle <i>ndhD</i> -293	99
Abbildung 3-9:	Neu identifizierte Edierungsstellen in <i>N. glutinosa</i>	102
Abbildung 3-10:	Kreuzungsschema zur Introgression einer <i>N. tabacum</i> spezifischen Edierungsstelle in den Kernhintergrund von <i>N. glutinosa</i>	106
Abbildung 4-1:	Sequenzhomologien des veränderten <i>cis</i> -Elements der Edierungsstelle <i>atpA</i> -264 in der Linie mA zu <i>cis</i> -Elementen anderer plastidären Edierungsstellen aus <i>N. tabacum</i>	112

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1:	Auswahl verschiedener Edierungssysteme	12
Tabelle 3-1:	Genotypen, Phänotypen und Beschreibung verwendeter und hergestellter Pflanzenlinien	67
Tabelle 3-2:	Cybriden mit <i>A. belladonna</i> Kerngenom und in <i>rpoC2</i> modifiziertem <i>N.</i> <i>tabacum</i> Plastom	70
Tabelle 3-3:	Genotypisierung der Cybriden mit <i>A. belladonna</i> Kerngenom und in <i>rpoC2</i> modifiziertem <i>N. tabacum</i> Plastom	71
Tabelle 3-4:	Edierung <i>N. tabacum</i> spezifischer Edierungsstellen in verschiedenen Cybriden	74
Tabelle 3-5:	Cybriden mit <i>A. belladonna</i> Kerngenom und in <i>atpA</i> modifiziertem <i>N.</i> <i>tabacum</i> Plastom	90
Tabelle 3-6:	Genotypisierung der Cybriden mit <i>A. belladonna</i> Kerngenom und in <i>atpA</i> modifiziertem <i>N. tabacum</i> Plastom	91
Tabelle 3-7:	Editotypenvergleich	95
Tabelle 3-8:	Unterschiede zwischen putativen <i>cis</i> -Elementen gemeinsamer Edierungsstellen von <i>A. belladonna</i> und <i>N. tabacum</i>	96
Tabelle 3-9:	Plastidäre Edierungsstellen in sechs Spezies innerhalb der Spermatophyta.....	100
Tabelle 3-10:	Heterologe Edierung und phylogenetische Verbreitung getesteter Edierungsstellen innerhalb der Spermatophyta	104
Tabelle 3-11:	Unterschiede zwischen putativen <i>cis</i> -Elementen gemeinsamer Edierungsstellen von <i>N. tabacum</i> und <i>N. glutinosa</i>	108

IV. Abkürzungen

AA	engl. Abk. für: Aminosäure
Ab	<i>Atropa belladonna</i>
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BAP	6-Benzylamino-Purin
bidest	zweifach destilliert
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
CDP	4-chloro-3-(methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)-Phenylphosphat
CIP	engl. Abk. für: alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
CMS	cytoplasmatische männliche Sterilität
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
dest	destilliert
DIG	Digoxigenin
DMI	Dobzhansky-Muller-Inkompatibilität
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EtOH	Ethanol
<i>hcf</i>	engl. Abk. für: starke Chlorophyllfluoreszenz
Indel	Insertion/Deletion
Kb	Kilobase(n)
Kbp	Kilobasenpaar(e)
LHC	engl. Abk. für: Lichtsammelkomplex
LSC	engl. Abk. für: große Einzelkopieregion
MeOH	Methanol
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NAA	1-Naphtalen-Essigsäure
NADP	Nicotinsäureamid-Adenosin-Dinucleotid-Phosphat
NBT/BCIP	Nitroblautetrazolium/5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat
NDH	NAD(P)H-Dehydrogenase
NMU	engl. Abk. für: N-Nitroso-N-methylharnstoff
Nt	<i>Nicotiana tabacum</i>
NTP	Nukleosidtriphosphat
ORF	engl. Abk. für: offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	engl. Abk. für: Polymerasekettenreaktion
PEP	engl. Abk. für: plastidär kodierte RNA Polymerase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
psi	engl. Abk. für: Pfund pro Quadrat-Inch
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RT	reverse Transkription
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
SNN	Samsun (NN); <i>Nicotiana tabacum</i> Varietät
TEMED	Tetramethylethylendiamin
tRNA	transfer RNA
UTR	engl. Abk. für: untranslatierte Region
v/v	engl. Abk. für: Volumen pro Volumen
w/v	engl. Abk. für: Gewicht pro Volumen
<i>ycf</i>	engl. Abk. für: hypothetischer chloroplastidärer Leserahmen

1. Einleitung

1.1 Die Plastide

Plastiden sind ein für Pflanzen charakteristisches Zellorganell. In höheren Pflanzen ist dieses Organell von einer doppelten Hüllmembran umgeben. Aus undifferenzierten Proplastiden gehen in Vielzellern, je nach Aufgabe, in unterschiedlichen Geweben verschiedene Plastidentypen hervor, beispielsweise Elaioplasten als Fettspeicher, Amyloplasten als Stärkespeicher oder Chromoplasten zur Einlagerung von Pigmenten. Die zentrale Funktion dieses Zellorganells ist jedoch die Photosynthese, die in den Chloroplasten stattfindet. Die Grundlage für die chemische Fixierung der Lichtenergie und somit für photoautotrophes Wachstum bildet ein für die Chloroplasten charakteristisches Endomembransystem, die Thylakoide. In der Thylakoidmembran sind sämtliche Multiproteinkomplexe verankert, die am lichtabhängigen Elektronentransport beteiligt sind, an dessen Ende die Energie in Form von ATP und Reduktionsäquivalenten (NADPH) für die Reduktion des Kohlenstoffs im Kohlendioxid bereitgestellt wird und somit die Grundlage für die Fixierung von Lichtenergie in chemisch gebundene Energie darstellt. Zusätzlich zu diesen, für photoautotrophes Wachstum essentiellen Aufgaben, finden noch zahlreiche Reaktionen des Primär- und Sekundärstoffwechsels in diesem Kompartiment statt.

1.1.1 Von der Endosymbiose zur Pflanzenzelle

Der Algenforscher Friedrich Schmitz beobachtete Ende des 19. Jahrhunderts, dass Chloroplasten sich autonom verhalten und niemals *de novo* entstehen, sondern durch Teilung auseinander hervorgehen. Dies veranlasste Schimper 1893 zu der Spekulation, dass Chloroplasten Symbionten sein könnten. Mereschkowsky vermutete schließlich in Cyanobakterien den möglichen Vorläufer der Chloroplasten und formulierte später in der Arbeit „Theorie der zwei Plasmaarten als Grundlage der Symbiogenesis, einer neuen Lehre von der Entstehung der Organismen“ die Gleichung „Tiere + Chloroplasten = Pflanzen“ (Mereschkowsky 1905, 1910). Umfassend dargestellt wurde die Endosymbiontenhypothese erst 1970 durch Lynn Margulis.

Nach heutigem Kenntnisstand ist der Ursprung der Plastiden in einem endosymbiotischen Ereignis vor mehr als 1,2 Milliarden Jahren zu suchen (Butterfield 2000). Die Aufnahme eines Vorläufers der heutigen Cyanobakterien durch eine eukaryotische Zelle, die bereits Vorläufer der heutigen Mitochondrien enthielt, führte dabei zunächst zu einer chimären Zelle mit autonomen Bestandteilen. Der ehemals autonome Endosymbiont ist jedoch in seiner jetzigen Form nicht mehr als autonom anzusehen. Selbst die häufig anzutreffende Bezeichnung als semiautonomes Zellorganell trifft nicht zu, bedenkt man dessen obligate Abhängigkeit vom „Wirt“ (Herrmann 1996, 1997). Dass es sich bei dem Endosymbionten tatsächlich um einen Vorfahren der rezenten Cyanobakterien handelt, bestätigten morphologische und molekulare Vergleiche von Cyanobakterien mit Chloroplasten (z.B. McFadden 1999). Entgegen früherer Annahmen führte die wachsende Verfügbarkeit von nukleären und plastidären DNA-Sequenzdaten verschiedenster photosynthetischer Organismen zu dem Schluss, dass Plastiden aus einem monophyletischen endosymbiotischen Ereignis hervorgegangen sind (Martin *et al.* 1998; Stoebe und Kowallik 1999; Rodriguez-Ezpeleta *et al.* 2005).

Die Fixierung der Endosymbiose, d.h. die Aufhebung der Autonomie des Endosymbionten, kann durch den Transfer essentieller Gene des Endosymbionten in den Nukleus des Wirts oder auch durch Genverlust erfolgen. Um den endosymbiotischen Prozess irreversibel zu machen, würde theoretisch der Verlust einer Komponente im Genom des Endosymbionten ausreichen, die im Anschluss vom Wirt zur Verfügung gestellt wird. Tatsächlich ist die Entwicklung vom freilebenden Organismus hin zum Zellorganell von massiven Umstrukturierungen aller beteiligten Genome geprägt. Vergleiche rezenter Vertreter der Cyanobakterien mit Plastiden hinsichtlich ihrer Genome zeigen, dass von den ursprünglich 3.000-7.000 Genen der Cyanobakterien (Kaneko *et al.* 1996) weniger als 5% in den Plastiden kodiert sind. Die Reduktion des plastidären Genoms ist Folge eines Verlustes von, in der Kombination von Endosymbiont und Wirt, redundanten Genen und dem Transfer genetischen Materials in erster Linie vom Endosymbiont in Richtung Zellkern (Martin und Herrmann 1998; Rujan und Martin 2001). Eine Analyse der Sequenzdaten aus *Arabidopsis thaliana* zeigte, dass ca. 18% des nukleären Genoms cyanobakteriellen Ursprungs sind, was einer Zahl von ca. 4.500 Genen entspricht (Martin *et al.* 2002). Dies verdeutlicht das Ausmaß der Umstrukturierung der beteiligten Genome, bereits

ohne dabei das Mitochondriengenom mit einzubeziehen. *In silico* Lokalisationsstudien für Produkte kernkodierter Gene cyanobakteriellen Ursprungs verdeutlichen zudem die Komplexität des Genomrearrangements. Nur etwa ein Drittel dieser Genprodukte von Genen cyanobakteriellen Ursprungs ist für einen Re-Import in die Plastiden vorausgesagt, insgesamt wird jedoch von 3.000-4.500 plastidären Proteinen ausgegangen (Leister 2003; Sun *et al.* 2004). Ein Großteil der Information im pflanzlichen Kerngenom ist also cyanobakteriellen Ursprungs und gleichzeitig ist das plastidäre Proteom mindestens dualen genetischen Ursprungs.

Der endosymbiotische Gentransfer kann als eine spezielle Art lateralen Gentransfers angesehen werden (Brown 2003), der nach wie vor andauert (Huang *et al.* 2003; Stegemann *et al.* 2003). Ob es sich also bei der heutigen Situation mit den ca. 100 im Plastidengenom kodierten Genen um eine Zwischenstufe auf dem Weg zum vollständigen Verlust dieses Genoms handelt (Herrmann 1997) oder ob und wenn ja welcher Selektionsdruck den Verbleib bestimmter Gene in diesem Kompartiment verantwortet, ist immer noch Gegenstand von Diskussionen. Ein Grund für den Erhalt von Genen für Hauptkomponenten der Elektronentransportkette könnte die Aufrechterhaltung der Redoxbalance in Chloroplasten sein. Signale, die den Redoxzustand der Thylakoidmembran zur Genregulation vermitteln, können so ohne Umweg über den Zellkern und innerhalb einer Zelle für jede Plastide individuell umgesetzt werden und somit sehr effizient eine Anhäufung toxischer reaktiver Sauerstoffspezies verhindern (Allen 1993, 2003).

1.1.2 Das Plastidenchromosom

Der Sequenzierung des plastidären Genoms (Plastom) von *Nicotiana tabacum* (Tabak, Shinozaki *et al.* 1986) und des Lebermooses *Marchantia polymorpha* (Ohyama *et al.* 1986) folgten bis heute über 50 weitere aus dem Reich der Pflanzen (Übersicht unter: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/euk_o.html). Ein für Landpflanzen typisches Plastidenchromosom ist zwischen 120 und 160 Kb groß und kann in Mesophyllzellen in bis zu 100 Kopien pro Chloroplast vorliegen, welche in Nukleoidstrukturen organisiert zu sein scheinen. Die Plastome verschiedener Arten zeigen große Homologien, wobei sich die je nach Art ca. 85-140 kodierten Gene in zwei Hauptgruppen einteilen lassen: Gene für die plastidäre Genexpression und

Gene für den Photosyntheseapparat (Palmer 1991; Sugiura 1995). Für den Genexpressionsapparat konnten neben Genen für Untereinheiten der plastidär kodierten RNA-Polymerase (PEP: Plastid Encoded RNA Polymerase) auch Gene für ribosomale Proteine sowie rRNAs und tRNAs identifiziert werden. Gene für den Photosyntheseapparat, die in sämtlichen Spezies plastidär kodiert vorgefunden werden, repräsentieren die Kernkomponenten der Reaktionszentren der Photosysteme I und II (PS I und II) sowie des Cytochrom b_6f Komplexes (Cyt b_6f), der plastidären F_0F_1 -ATPase und des NADPH Dehydrogenasekomplexes (NDH-Komplex). Neben der großen Untereinheit des Schlüsselenzyms des Calvin-Zyklus zur Kohlenstofffixierung, Rubisco (*rbcL*), finden sich noch einige wenige Gene anderer Funktionen und einige offene Leserahmen unbekannter Funktion (ORF: open reading frame, *ycf*: hypothetical chloroplast reading frame, Sugiura 1992) in einem typischen Plastidengenom. Die plastidären Chromosomen der meisten bisher untersuchten Arten lassen sich in vier charakteristische Bereiche unterteilen. In der etablierten zirkulären Darstellung eines Plastidenchromosoms separieren zwei invertierte repetitive Bereiche IR_A und IR_B (IR: Inverted Repeat) die große und die kleine Einzelkopieregion (LSC: Large Single Copy Region, SSC: Small Single Copy Region). Diese zirkuläre Darstellung muss nach neueren Ergebnissen jedoch überdacht werden, da zumindest für *Zea mays* bewiesen wurde, dass der Anteil an zirkulären DNA-Molekülen nicht mehr als 3-4% beträgt und der Rest als lineare Moleküle, mit höchstwahrscheinlich definierten Enden, teils in komplexen Strukturen vorliegt, die auf eine rekombinationsabhängige Form der Replikation zurückzuführen sein könnten (Bendich 2004; Oldenburg und Bendich 2004).

1.1.3 Die plastidäre Genexpression

Die plastidäre Genexpression erinnert in vielen Bereichen an die des freilebenden eubakteriellen Vorläufers. Teile der Transkriptions-, Prozessierungs- und Translationsmaschinerie lassen sich deutlich einem prokaryotischen System zuordnen, wie beispielsweise polycistronische Genorganisation, verschiedene regulatorische Transkriptprozessierungsschritte oder aber auch 70S Ribosomen. An anderen Stellen ist die Einbettung des Zellorganells in ein eukaryotisches System zu erkennen. So können zum Beispiel polycistronische Transkripte teilweise nicht mehr ohne intercistronische Prozessierung translatiert werden (Barkan *et al.* 1994; Hirose und

Sugiura 1997). Das prokaryotische Spektrum wird zudem durch neue Prozessierungsschritte, wie beispielsweise RNA Edierung, erweitert.

Im Folgenden sollen nur die für diese Arbeit relevanten Genexpressionsschritte betrachtet werden.

1.1.3.1 Plastidäre Transkription

Die Transkription in Plastiden von Landpflanzen wird von mindestens zwei verschiedenen RNA-Polymerasen bewerkstelligt: einer plastidär kodierten RNA-Polymerase (PEP) und mindestens einer nukleär kodierten RNA-Polymerase (NEP: Nuclear Encoded RNA-Polymerase) (Hess und Börner 1999). Die entstehenden Produkte sind dabei typischerweise polycistronisch und werden co- oder posttranskriptional prozessiert.

Die PEP ist vom eubakteriellen Typ $\alpha_2\beta\beta'$, deren Komponenten des Apoenzyms (*rpo*-Gene) im Plastom kodiert sind (Igloi und Kössel 1992), wobei die β' -Untereinheit aus zwei separat kodierten Polypeptiden β' und β'' (kodiert durch *rpoC1* und *rpoC2*) zusammengesetzt ist. Die von der PEP erkannten Promotoren ähneln ebenfalls dem eubakteriellen Pendant. Die -10 (Pribnow-/TATA-Box) und -35 Elemente sind jedoch in ihrem Abstand zum jeweiligen Transkriptionsstart teils weniger konserviert als in Prokaryoten (Allison 2000). Die spezifische Promotorerkennung bzw. -bindung erfolgt in prokaryotischen Systemen durch Sigmafaktoren. Erst das Holoenzym $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ ist somit zur Transkriptionsinitiation fähig. Tatsächlich konnten Sigmafaktor-ähnliche Proteine (SLF: Sigma Like Eactor) schon früh in *Chlamydomonas reinhardtii*, Spinat und Senf identifiziert werden (Surzycki und Shellenbarger 1976; Bülow und Link 1988; Lerbs *et al.* 1988). Auch im Kerngenom von *Arabidopsis thaliana* konnten Leserahmen der entsprechenden Genfamilie zugeordnet werden (ArabidopsisGenomeInitiative 2000). Die Untersuchung einer hellgrünen *A. thaliana* Linie *abc1* mit einer T-DNA-Insertion in *SIG2* (*sigB*) zeigte eine reduzierte Akkumulation von in die Photosynthese involvierten Proteinen (Kanamaru *et al.* 2001). Eine T-DNA-Insertion in *SIG4* führt zu verminderter Akkumulation bestimmter plastidärer Transkripte (Favory *et al.* 2005). Eine kerngesteuerte Genregulation mittels Sigmafaktoren liegt somit nahe. Die Hauptbindestelle für Sigmafaktoren innerhalb

des Apoenzyms in eubakteriellen Systemen ist die β' -Untereinheit (Arthur und Burgess 1998; Arthur *et al.* 2000). Die homologe Region dieser Sigmafaktorbindestelle liegt in Plastiden innerhalb der von *rpoC2* kodierten β'' -Untereinheit (Igloi und Kössel 1992).

Nukleär kodierte RNA-Polymerasen für die Expression proteinkodierender plastidärer Gene bestehen aus nur einer Untereinheit und zeigen Ähnlichkeit mit RNA-Polymerasen in T3/T7 Bakteriophagen (Lerbs-Mache 1993). In *A. thaliana* konnten drei Gene, *RPOT1*, *RPOT2* und *RPOT3*, identifiziert werden, welche für Polymerasen unterschiedlicher Lokalisation kodieren. Während *RPOT1* in Mitochondrien und *RPOT3* in Plastiden importiert wird, konnte für *RPOT2* eine Lokalisation für beide Kompartimente nachgewiesen werden (Hedtke *et al.* 1997; Hedtke *et al.* 1999a; Hedtke *et al.* 2000). Die Promotor-Kernregion der plastidär lokalisierten NEP ist gekennzeichnet durch ein YRT-Motiv, welches innerhalb eines 15 Nukleotide umfassenden AT-reichen Segments im direkten 5'-Bereich der Transkriptionsinitiationsstelle liegt (Liere und Maliga 1999). Die Regulation der NEP scheint generell entwicklungs- und gewebespezifisch zu erfolgen (Emanuel *et al.* 2004; Emanuel *et al.* 2006).

Zunächst wurden für die verschiedenen Polymerasen verschiedene Aufgaben in teilweise unterschiedlichen Entwicklungsstufen der Plastiden vorgeschlagen. In PEP defizienten Pflanzen akkumulierten dabei hauptsächlich Transkripte von Genen des genetischen Apparats. Somit wurde der NEP die Aufgabe zugesprochen für die Transkription des genetischen Apparates inklusive der PEP in meristematischem Gewebe, also Proplastiden, verantwortlich zu sein, während in späteren Entwicklungsstadien, also Chloroplasten, die nun vorhandene PEP für die Transkription photosyntheseassoziiierter Gene und des genetischen Apparates zuständig sein sollte. Diese Annahme wurde durch die vor den entsprechenden plastidären Genen identifizierten Promotoren unterstützt (Hajdukiewicz *et al.* 1997). Spätere Untersuchungen an PEP defizienten Tabakmutanten zeigten jedoch, dass sämtliche plastidäre Gene durch die NEP transkribiert werden können, was die strikte Trennung der Transkription verschiedener funktionell verwandter Gengruppen durch die in den unterschiedlichen Kompartimenten kodierten RNA-Polymerasen in Frage stellt (Krause *et al.* 2000; Legen *et al.* 2002).

1.1.3.2 Plastidäre RNA Edierung

Der Begriff RNA Edierung beschreibt die stellenspezifische Veränderung von Transkripten deren mature Form sich dadurch in ihrer Sequenz von der genomischen Sequenz unterscheidet. Spezielle Modifikationen, wie beispielsweise Spleißen oder Polyadenylierung sind dabei ausgenommen. Zum ersten Mal beschrieben wurde RNA Edierung für die Insertion und Deletion von Uridinen in mitochondrialen Transkripten von Trypanosomen, die das Leseraster wiederherstellen (Benne *et al.* 1986). Seither wurden verbreitet über eine Vielzahl von Organismen verschiedene Modifikationen als RNA Edierung beschrieben, die sowohl mRNAs, tRNAs, rRNAs und die 7SL RNA betreffen. Neben der Insertion bzw. Deletion einzelner oder mehrerer Nukleotide können an definierten Positionen Nukleotidkonversionen, beispielsweise von Adenosin zu Inosin (A-I) oder von Cytidin zu Uridin (C-U), zu einer Veränderung der Kodierung oder Struktur führen (Tab. 1-1, zusammengefasst in Gott und Emeson 2000). Die Variabilität der verschiedenen bisher identifizierten Mechanismen legt einen polyphyletischen Ursprung der verschiedenen RNA Edierungssysteme nahe.

Tabelle 1-1: Auswahl verschiedener Edierungssysteme

Taxon	Kompartiment	Edierungstyp	Betroffene RNAs
Kinetoplastiden (Trypanosoma, Leishmania)	Mitochondrium	U Insertionen/Deletionen	mRNAs
Viren (Mumps, Masern, HIV, Ebola)	Wirtscytoplasma	G oder A Insertionen	mRNAs
Schleimpilze (<i>Physarum</i>)	Mitochondrium	Nukleotidinsertionen, C zu U	mRNAs, tRNAs, rRNAs
Pflanzen (Moose, Farne, Gymno-, Angiospermen)	Mitochondrium, Plastide	C zu U, U zu C	mRNAs, tRNAs, rRNAs
Mollusken (Schnecken)	Mitochondrium	A zu I	tRNAs
Insekten (<i>Drosophila</i>)	Nukleus	A zu I	tRNAs
Plazentalier (Mensch, Maus)	Nukleus	C zu U, A zu I	mRNAs
Marsupialier (Opposum)	Mitochondrium	C zu U	tRNAs

zusammengefasst in Gott und Emeson, 2000

1.1.3.2.1 Charakteristika plastidärer RNA Edierung

In plastidären Transkripten wurde RNA Edierung zum ersten Mal für das *rpl2* Start-Codon in Mais beschrieben. An der dem *rpl2* Start-Codon (ATG) in anderen Spezies homologen Position befindet sich im Maisplastom ein ACG Threonincodon. Die Untersuchung der cDNA erbrachte den Beweis, dass ähnlich wie in Mitochondrien von Pflanzen (Covello und Gray 1989; Gualberto *et al.* 1989; Hiesel *et al.* 1989) auch in Plastiden RNA Edierung stattfindet. Das ACG Codon fungiert also nicht, wie ursprünglich erwartet wurde, als Start-Codon, sondern wird auf mRNA-Ebene in das kanonische AUG Start-Codon überführt (Hoch *et al.* 1991). Neben weiteren Edierungsstellen, welche in plastidären Transkripten zur Herstellung von AUG Start-Codons dienen (Kudla *et al.* 1992; Kuntz *et al.* 1992; Bock *et al.* 1993), wurden auch Edierungsstellen innerhalb kodierender Regionen (Maier *et al.* 1992a; Maier *et al.* 1992b) und zur Generierung von Stop-Codons identifiziert (Wakasugi *et al.* 1996). Zum einen können also in Plastiden durch RNA Edierung Leserahmen hergestellt werden und zum anderen kann die Kodierung innerhalb von Leserahmen verändert werden.

Bis jetzt konnte mit Ausnahme des Lebermooses *Marchantia polymorpha* (Oda *et al.* 1992; Ohyama 1996; Freyer *et al.* 1997; Steinhauser *et al.* 1999) in Plastiden aller untersuchten Landpflanzen RNA Edierung des Konversionstyps gezeigt werden. Für die Spermatophyta wurden dabei bisher ausschließlich C-U Transitionen nachgewiesen. Innerhalb der Pteridophyta, für *Adiantum capillus-veneris*, (Wolf *et al.* 2004) und innerhalb der Bryophyta, für *Anthoceros formosae*, (Kugita *et al.* 2003) kann Edierung auch in reverser Richtung erfolgen (U-C).

Ein Vergleich kodierender Regionen von Samenpflanzen, Farnen und Moosen zeigte, dass RNA Edierung in Plastiden generell zur Herstellung des an der jeweiligen Codonposition konservierten Codons führt (Maier *et al.* 1996). Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass die unedierte Form des Transkripts zu einem Funktionsverlust des betroffenen Proteins führen kann. So zeigte z.B. ein transplastomischer Ansatz in *N. tabacum*, dass die nicht-edierte Form des *psbF*-Transkripts zu einem mutanten Phänotyp führt (Bock *et al.* 1994). In *Chlamydomonas reinhardtii* konnte für die unedierte Form des *petB*-Transkripts ebenfalls ein mutanter Phänotyp beobachtet werden (Zito *et al.* 1997). Auch die nicht-edierte Form der in

Plastiden durch *accD* kodierten β -Untereinheit der Carboxyltransferase der plastidären Acetyl-CoA-Carboxylase führt *in vitro* zum Aktivitätsverlust der Carboxyltransferase und des Holoenzym, was eine essentielle Funktion der Edierung der entsprechenden Position in *accD* impliziert (Sasaki, Y. *et al.* 2001). Offensichtlich kann die an der jeweiligen Position konservierte Aminosäure, deren Kodierung durch Edierung hergestellt wird, von funktioneller Relevanz sein.

Allerdings gibt es auch hierfür Ausnahmen. So wurde für die zweite Position in Codon 206 von *rpoB* in *Zea mays* Edierung beschrieben, während die homologe Stelle in *Hordeum vulgare* (Zeltz *et al.* 1993) und *Oryza sativa* (Corneille *et al.* 2000) unediert bleibt und somit die funktionelle Relevanz der Edierung dieser Stelle in Mais unklar ist. Eine weitere Ausnahme im Bezug auf die Bedeutung von Edierungsstellen stellt auch die „stille Edierung“ an der dritten Position des Codons 265 in *atpA* von *N. tabacum* dar. C-U Edierungen sind an dritten Codonpositionen synonym, eine funktionelle Relevanz darf deshalb hierfür bezweifelt werden (Hirose *et al.* 1996).

Ebenfalls unklar ist die Funktion für Edierung außerhalb offener Leserahmen, was für plastidäre Transkripte in Samenpflanzen erst zweimal beschrieben wurde (Kudla und Bock 1999; Drescher *et al.* 2002). Für die Edierungsstelle in der 5'-UTR (Untranslated Region) von *ndhG* in *Zea mays* zeigten *in silico* Analysen unterschiedliche Sekundärstrukturen der RNA in Abhängigkeit des durch Edierung modifizierten Nukleotids (ediert U/unediert C), was einen Einfluss auf die Transkriptstabilität und/oder die Translationseffizienz des *ndhG*-Transkriptes haben könnte. Als weitere Möglichkeit wurde jedoch diskutiert, dass Edierung zur Herstellung eines konservierten Phenylalanin Codons in einem zwölf Codons umfassenden, bisher nicht beschriebenen ORF führt und es sich somit nicht um Edierung in einer UTR handeln würde (Drescher *et al.* 2002).

1.1.3.2.2 Mechanistik plastidärer RNA Edierung

Der Mechanismus der Edierungsreaktion in plastidären Transkripten ist bisher nicht geklärt. Vermutet wird eine De- oder Transaminierungsreaktion des Cytosins am C-4, was unmittelbar zu Uracil führt und somit die einfachste Erklärung wäre. Ergebnisse biochemischer Analysen des mitochondrialen Edierungssystems in Pflanzen bestätigten eine stellenspezifische Deaminierung eines Cytidins (Yu und Schuster 1995). Die Ähnlichkeiten der Edierungssysteme legen einen vergleichbaren

Mechanismus für Plastiden nahe. *In vitro* Experimente für plastidäre Edierung bewiesen, dass das radioaktive α -Phosphat am zu edierenden Cytidin nach der Behandlung mit edierungskompetentem Chloroplastenextrakt am Uridin erhalten war, was auf eine Deaminierung des Cytidins hindeutet, da die Edierungsreaktion ohne Austausch des Phosphatrestes stattfindet (Hirose und Sugiura 2001). Im Gegensatz zu den Analysen des mitochondrialen Systems (Yu und Schuster 1995) wurde jedoch für Chloroplasten nicht ausgeschlossen, dass eine Basensubstitution mittels einer Transglykosylierungsreaktion erfolgen könnte (Hirose und Sugiura 2001). Den Beweis, dass in Plastiden *in vivo* ein Uridin in der edierten Form eines Transkripts vorliegt, erbrachte eine rSSCP Analyse (RNA Single Strand Conformational Polymorphism) einer Edierungsstelle in *ndhA*. Das entsprechende mRNA-Fragment aus Mais Gesamt-RNA, verhielt sich in einer elektrophoretischen Auftrennung genauso, wie ein aus einer *in vitro* Transkription hervorgegangenes RNA-Fragment, welches an der entsprechenden Position ein Uridin enthält (Fuchs *et al.* 2001). Das durch Sequenzanalysen von cDNA an Edierungsstellen detektierte Thymidin (T) ist somit nicht als Artefakt zu deuten, welches aufgrund der enzymatischen Reaktionen zwischen RNA-Isolierung und Sequenzierung die eigentliche Modifikation des Cytidins auf mRNA-Ebene verschleiert. Höchstwahrscheinlich ist am Edierungsprozess also eine Cytidin De- oder Transaminase beteiligt.

Die Edierungsreaktion scheint im Allgemeinen ein früher Prozess in der Transkriptreifung zu sein, der in einigen Fällen als unabhängig von anderen Reifungsprozessen beschrieben ist (Freyer *et al.* 1993; Hirose *et al.* 1994; Ruf *et al.* 1994). Für eine Edierungsstelle in *ndhA*, die nur wenige Nukleotide von der Intron-Exon Grenze entfernt ist, zeigten Untersuchungen in Gerste jedoch, dass nicht gespleißte Transkripte ausschließlich unediert vorlagen (Del Campo *et al.* 2000). Untersuchungen der homologen Edierungsstelle aus Spinat in Tabak bewiesen die Abhängigkeit der Edierung vom Spleißen (Schmitz-Linneweber *et al.* 2001).

1.1.3.2.3 Faktoren plastidärer RNA Edierung

RNA Edierung findet an hochspezifischen Nukleotidpositionen statt. Daher muss von einer Beteiligung spezifischer *cis*-Determinanten ausgegangen werden, die eine Edierungsstelle als solche markieren.

Im unmittelbaren Sequenzbereich um Edierungsstellen konnte kein Konsensusmotiv identifiziert werden. Es wurde lediglich eine Tendenz zu einem Pyrimidin 5' und einem Adenosin 3' der Edierungsstelle festgestellt (Maier *et al.* 1996; Hirose *et al.* 1999). Die ersten Charakterisierungen von *cis*-Elementen, die als Erkennungsmotiv für einen entsprechenden *trans*-Faktor in Frage kommen könnten, erfolgten *in vivo* durch transplastomische Untersuchungen. Für *psbL*-1 (Startcodon) in Tabak war ein 22 Nukleotide umfassendes Segment (-16/+5 zur Edierungsstelle) hinreichend für Edierung (Chaudhuri und Maliga 1996). Für zwei *ndhB*-Edierungsstellen in Tabak in Codon 246 und 249 konnte die Region von -12 bis -2 vor der Edierungsstelle in Codon 246 als essentiell für die Edierung beider Stellen identifiziert werden (Bock *et al.* 1996). Eine Ausnahme hinsichtlich der Beschränkung der *cis*-Elemente auf ca. 30 proximale Nukleotide sind die Edierungsstellen in *ndhB*-196 und -204 in Tabak, deren Sequenzkontext von -42 bis +42 *in vivo* nicht ausreichend für Edierung zu sein scheint (Bock *et al.* 1996). *In vitro* Untersuchungen bestätigten die Lage von *cis*-Elementen in einer Region von -20 bis +9 zu den jeweiligen Edierungsstellen (Hirose und Sugiura 2001). Mit Hilfe eines *in vitro* Edierungssystems erfolgte auch eine weitere Feinkartierung essentieller Bestandteile der *cis*-Elemente für die Edierungsstellen in *petB*-204 und *psbE*-72. Der kritische Bereich für die Bindung des *trans*-Faktors konnte hier auf -20/-6 respektive -15/-6 eingegrenzt werden, wobei auch weitere Nukleotide im Bereich -5/+5 für die Edierung der Stellen essentiell sind (Miyamoto *et al.* 2002, 2004). Eine Substitution des direkt benachbarten Nukleotids stromaufwärts der Edierungsstelle kann sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* die Effizienz der Edierung stark reduzieren (Bock *et al.* 1996; Miyamoto *et al.* 2004) sowie *in vitro* die Bindung des *trans*-Faktors stören (Miyamoto *et al.* 2004). Die weiteren, im unmittelbaren 5'-Bereich der Edierungsstelle liegenden Nukleotide könnten als eine Art Abstandhalter zwischen Faktorbindestelle und Edierungsstelle fungieren, was auch durch *in vivo* Daten unterstützt wird. Nach einer Deletionen in diesem Bereich wurde nicht mehr das ursprüngliche Nukleotid, sondern das sich nach der Deletion im entsprechenden Abstand befindende Cytidin ediert (Hermann und Bock 1999).

Das Fehlen einer Konsensussequenz sowie die Beobachtung, dass aus fremden Arten künstlich eingebrachte Edierungsstellen nur erkannt werden, wenn Homologe im eigenen Plastom zu finden sind (Bock *et al.* 1994; Reed und Hanson 1997, vgl.

1.1.3.2.4), war ein Hinweis, dass für die Erkennung jeder Edierungsstelle ein spezifischer *trans*-Faktor – der „Spezifitätsfaktor“ – verantwortlich sein könnte.

Einige Edierungsstellen scheinen jedoch gemeinsam von einem Spezifitätsfaktor erkannt zu werden. Die ektopische Überexpression einer Edierungsstelle kann dazu führen, dass durch kompetitive Effekte der Spezifitätsfaktor titriert wird und somit sowohl die ektopisch erhöht exprimierte Edierungsstelle, als auch die endogene Edierungsstelle nur noch partiell ediert sind (Chaudhuri *et al.* 1995; Reed und Hanson 1997; Reed *et al.* 2001). Partielle Edierung bedeutet, dass ein Teil des jeweiligen Transkriptpools – z.B. aufgrund eines limitierenden Spezifitätsfaktors – unediert bleibt. Ist der entsprechende Spezifitätsfaktor in die Edierung mehrerer Stellen involviert, sollte der Titrationseffekt alle von diesem Spezifitätsfaktor bedienten Edierungsstellen betreffen. Für zwei ektopisch überexprimierte Edierungsstellen in Tabak konnte tatsächlich eine Reduzierung der Edierungseffizienz für die jeweils homologen und für verschiedene nicht-homologe Edierungsstellen beobachtet werden, was auf die „Koedierung“ durch einen Spezifitätsfaktor hindeutet (Chateigner-Boutin und Hanson 2002). In den *cis*-Elementen, potentiell durch einen einzigen Spezifitätsfaktor erkannter Edierungsstellen, wurden Sequenzhomologien identifiziert. Solche mehr oder weniger signifikanten Sequenzhomologien waren dann die Basis zur Einteilung weiterer Edierungsstellen in Cluster (Chateigner-Boutin und Hanson 2003; Tillich *et al.* 2005).

Der Kodierungsort von Edierungsfaktoren wurde aufgrund der fehlenden Kodierungskapazität des plastidären Genoms im Zellkern vermutet. Selbst wenn nur ein Spezifitätsfaktor pro Edierungsstellencluster nötig wäre (Chateigner-Boutin und Hanson 2003), bedürfte es mehr als zehn solcher individueller Spezifitätsfaktoren. Nahezu allen plastidären Leserahmen sind jedoch bereits andere Funktionen zugeordnet. Einen direkteren Hinweis auf den Kodierungsort von Spezifitätsfaktoren hatten Untersuchungen einer spinatspezifischen *psbL*-Edierungsstelle ergeben, welche in Tabak nicht ediert wurde (Bock *et al.* 1994). Die Fusionierung von Protoplasten dieser transplastomischen Tabaklinien mit Spinatprotoplasten führte zu hybriden Zellen, in denen Edierung für die spinatspezifische Stelle in Tabakplastiden nachgewiesen werden konnte, wofür die wahrscheinlichste Erklärung der Import des im Spinatzellkern kodierten Edierungsfaktors war (Bock und Koop 1997). Weitere Hinweise auf den Kodierungsort von Edierungsfaktoren erbrachten Analysen

plastidärer Edierungsstellen in den Gerste- und Maismutanten, *albostrians* respektive *iojap*, die zeigten, dass Edierung in den für diese Mutanten beschriebenen ribosomendefizienten Plastiden funktionierte (Zeltz *et al.* 1993; Halter *et al.* 2004). Dies schließt plastidär kodierte Proteinfaktoren aus und zeigt außerdem, dass die Edierungsreaktion unabhängig von plastidärer Translation ist.

In anderen Edierungssystemen ist Edierung guideRNA (gRNA) vermittelt (Blum, B. *et al.* 1990). Die Suche nach im Tabakplastom kodierten gRNAs blieb ohne positives Ergebnis (Bock und Maliga 1995). Auch neuere Daten sprechen eher gegen in plastidäre RNA Edierung involvierte gRNAs: so blieb die Edierungsaktivität eines Chloroplastenextraktes *in vitro* trotz Behandlung mit Mikrokokkus Nuklease erhalten. Des weiteren konnten keinerlei RNA-Moleküle durch UV-Crosslinks identifiziert werden, welche mit dem *cis*-Element der *psbL*-1 Edierungsstelle interagieren (Hirose und Sugiura 2001). Für Proteinfaktoren waren entsprechende Versuche jedoch erfolgreich. So konnten für drei verschiedene Edierungsstellen spezifische RNA-Protein-Komplexe verschiedener Größe nachgewiesen werden (Hirose und Sugiura 2001; Miyamoto *et al.* 2002). Die Zahl identifizierter Proteinfaktoren, die an Edierungsprozessen beteiligt sind, beschränkt sich jedoch bisher auf zwei. CP31 scheint generell für Edierung essentiell zu sein. Die *in vitro* Edierung zweier Stellen zeigte sich abhängig von der Anwesenheit dieses abundanten stromalen RNA-Bindeproteins (Hirose und Sugiura 2001). Der zweite Faktor, CRR-4, ist als essentiell für die Edierung von *ndhD*-1 in *A. thaliana* beschrieben (Kotera *et al.* 2005), wobei die direkte Interaktion dieses Faktors mit der Edierungsstelle bisher nicht gezeigt wurde. CRR-4 ist aufgrund seiner RNA-Bindedomänen der Familie der PPR-Proteine (Pentatricopeptid Repeat) zugeordnet, für die neben der RRM-Proteinfamilie (RNA recognition motif) bereits zu einem früheren Zeitpunkt eine Beteiligung an Edierung in Plastiden (und Mitochondrien) diskutiert wurde. Für beide Proteinfamilien konnten genügend nukleär kodierte Gene identifiziert werden, deren Produkte *in silico* Vorhersagen zur Folge organellenlokalisiert sind und somit auch für die über 400 Edierungsstellen im mitochondriellen Genom von *A. thaliana* (Giege und Brennicke 1999) jeweils ein Spezifitätsfaktor zur Verfügung stehen würde (Small und Peeters 2000; Vermel *et al.* 2002, nicht publizierte Daten). Ob solche Spezifitätsfaktoren durch Interaktion mit einer katalytischen Untereinheit (De-/Transaminase) einen edierungsaktiven Enzymkomplex bilden, oder ob die Spezifitätsfaktoren selbst katalytisch aktiv sind, ist noch nicht geklärt (Miyamoto *et al.* 2004). Genauere

Aussagen hierzu werden erst mit der Identifizierung weiterer, für die Edierung essentieller Faktoren möglich sein.

1.1.3.2.4 Evolution plastidärer Edierungsstellen

Die erste systematische Bestimmung sämtlicher Edierungsstellen innerhalb eines plastidären Genoms erfolgte für *Zea mays* (Maier *et al.* 1995). Die Annahme, dass *Marchantia polymorpha* nicht über ein funktionelles Edierungssystem in Mitochondrien verfügt (Oda *et al.* 1992) und die Tatsache, dass in *Marchantia polymorpha* häufig bereits die konservierte Aminosäure genomisch kodiert ist, die in anderen Spezies durch Edierung hergestellt wird, machten *Marchantia polymorpha* zu einer Referenz für die Identifizierung plastidärer Edierungsstellen. Insgesamt konnten mit diesem systematischen Ansatz 29 Edierungsstellen innerhalb des Maisplastoms identifiziert werden (Maier *et al.* 1995; Tillich *et al.* 2001, nicht publizierte Daten). Die Gesamtheit plastidärer Edierungsstellen einer Spezies wird als plastidärer Editotyp bezeichnet (im Folgenden nur „Editotyp“). Nachfolgende Bestimmungen der Editotypen für *Pinus thunbergii* (Wakasugi *et al.* 1996; Sasaki, Y. *et al.* 2001), *Nicotiana tabacum* (Hirose *et al.* 1999), *Arabidopsis thaliana* (Lutz und Maliga 2001; Tillich *et al.* 2005), *Atropa belladonna* (Schmitz-Linneweber *et al.* 2002), *Nicotiana sylvestris und tomentosiformis* (Sasaki, T. *et al.* 2003) und *Pisum sativum* (Inada *et al.* 2004) erfolgten auf ähnliche Weise, wie in Maier *et al.* (1995) beschrieben. Die Anzahl der identifizierten Edierungsstellen eines Editotyps liegt für Samenpflanzen in der Größenordnung von 30. Dieser relativ konstanten Anzahl an Edierungsstellen stehen jedoch unterschiedliche Muster der Verteilung der Edierungsstellen im Genom verschiedener Arten gegenüber (Übersichtartikel: Schmitz-Linneweber *et al.* 2004). Dabei ist die Anzahl von zwischen verschiedenen Arten konservierten Edierungsstellen an homologen Positionen umgekehrt proportional zur phylogenetischen Distanz. Während die Solanaceen *Atropa belladonna* (33 Edierungsstellen) und *Nicotiana tabacum* (35 Edierungsstellen) 30 Edierungsstellen an homologen Positionen haben, teilt sich *Nicotiana tabacum* mit *Pinus thunbergii* (27 Edierungsstellen) nur zwei Edierungsstellen (Übersicht in Funk *et al.* 2004).

Eine Analyse mitochondrialer und plastidärer Edierungsstellen zeigte, dass C-T Transitionen an Edierungsstellen häufiger auftreten als an dritten Codonpositionen (Shields und Wolfe 1997). Diese Fluktuation von Edierungsstellen scheint somit auf

einer Selektionsneutralität bezüglich des genomisch kodierten T, verglichen mit dem auf RNA-Ebene durch Edierung hergestellten U zu beruhen. Edierungsstellen könnten sich somit in einem Gleichgewicht zwischen Entstehung (T-C Mutation und C-U Edierung) und Verlust (C-T Mutation) befinden. Die Entstehung artspezifischer Editotypen kann jedoch auch durch den sukzessiven Verlust von Edierungsstellen an verschiedenen unabhängigen Positionen, ausgehend von einer hohen Anzahl plastidärer Edierungsstellen in ursprünglichen Landpflanzen, erklärt werden (Tillich *et al.* 2006a).

Transplastomische Untersuchungen gaben auch Hinweise darauf, dass nicht nur die Fluktuation der Edierungsstellen evolutionär sehr dynamisch ist, sondern ebenso die entsprechenden Faktoren vermeintlich schnell evolvieren. Im *psbF*-Transkript wird in Spinat das Serincodon (uCu) an Position 26 ediert, was zu einer Veränderung der Kodierung zum an dieser Stelle konservierten Phenylalanin (uUu) führt. In Tabak ist das Phenylalanin bereits genomisch kodiert. Der Austausch des Tabak *psbF*-Gens (T auf DNA) gegen das des Spinats (C auf DNA) führte zu nicht-edierten spinatspezifischen *psbF*-Transkripten in Tabakplastiden (vgl. oben, Bock *et al.* 1994). Offensichtlich fehlt Tabak in Folge des fehlenden Selektionsdrucks zur Herstellung einer konservierten Aminosäure mittels Edierung der entsprechende Spezifitätsfaktor zur Erkennung der spinatspezifischen Edierungsstelle. Ein ähnliches Experiment für zwei Edierungsstellen in *rpoB* aus Mais bestätigte die Hypothese, dass Edierungsstelle und Spezifitätsfaktor evolutionär gekoppelt sind. Hierbei wurden die Edierungsstellen *rpoB*-156 und *rpoB*-206 aus Mais als Minigen ektopisch in das Plastidengenom von Tabak eingebracht. Während es zur Edierungsstelle *rpoB*-156 in Tabak an Codonposition 158 eine homologe Edierungsstelle gibt, verhält es sich für Edierungsstelle *rpoB*-206 (Homologe Position in Tabak: 208) wie für die bereits beschriebene *psbF*-Edierungsstelle aus Spinat (vgl. oben): Tabak kodiert bereits das konservierte Codon genomisch. Es zeigte sich, dass die zur Tabakedierungsstelle homologe Edierungsstelle (*rpoB*-156) ediert wurde, also die Faktoren bereitstanden, während die heterologe Edierungsstelle *rpoB*-206 unediert blieb (Reed und Hanson 1997). Weiter konnte für die Edierungsstelle *psbE*-72 in Tabak gezeigt werden, dass ein Faktor aus einem Plastidenextrakt von Tabak *in vitro* an das *cis*-Element der Edierungsstelle bindet, während dieser Faktor im Plastidenextrakt aus Erbse nicht nachgewiesen werden konnte, was mit der Abwesenheit der Edierungsstelle (T auf

DNA) in Erbse einhergeht (Miyamoto *et al.* 2002). Spezifitätsfaktoren schienen somit stellenspezifisch zu sein und eine evolutionäre Einheit mit der entsprechenden Edierungsstelle zu bilden.

Die These der strikten Koevolution von Edierungsfaktor und -stelle wurde jedoch widerlegt durch die ektopische Expression eines Minigens in Tabakplastiden, welches die spinatspezifische *ndhA*-189 Edierungsstelle enthielt. Trotz des in Tabak bereits auf DNA-Ebene kodierten konservierten Codons (T auf DNA) zeigte sich, dass Tabak die Kapazität für die Edierung dieser Stelle besitzt (Schmitz-Linneweber *et al.* 2001).

1.2 Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität

Die Rearrangements der Genome ehemals autonomer Organismen nach der primären Endosymbiose führte zu der Situation, dass sämtliche Prozesse innerhalb der pflanzlichen Zelle nun für alle Kompartimente koordiniert ablaufen müssen (Blier *et al.* 2001; Herrmann *et al.* 2003). Bei Vielzellern kommt dazu noch eine räumliche Komponente, da zum Beispiel den verschiedenen Plastidentypen in unterschiedlichen Geweben differentielle Aufgaben zukommen (Herrmann *et al.* 2003). So sind die verschiedenen intrazellulären Genome als eine evolutionäre Einheit zu sehen. Mutationen in einem dieser Genome haben Auswirkungen auf das Gesamtsystem (Hedtke *et al.* 1999b; Whitney *et al.* 1999; Rodermel 2001). Umgekehrt bedeutet dies, dass selektive Kräfte auf das Gesamtsystem wirken, was zu einer Koevolution der beteiligten Genome führt (Herrmann *et al.* 2003).

Wie weit diese Koevolution fortgeschritten ist, wird bei einem Austausch der Organellen sogar nah verwandter Arten deutlich. Interspezifische Kreuzungen der Gattung *Oenothera* führten zu aberranten Phänotypen, die Pigment-Defizienzen zeigten (Bastardbleichheit/Bastardscheckung) oder in manchen Fällen nicht lebensfähig waren (Renner 1934; Stubbe 1963, 1989). Renner erkannte bereits 1934 aufgrund der Unterschiede in der Nachkommenschaft reziproker Kreuzungen, dass der Grund für das Phänomen der Bastardbleichung/-scheckung in der Verschiedenheit des Erbguts der Plastiden der Eltern liegen musste. Basierend auf unzähligen Kreuzungsexperimenten ordnete Stubbe 1959 Plastiden diverser *Oenothera* Arten fünf Reaktionstypen zu, die sich zu verschiedenen Kerngenomen unterschiedlich verhalten.

Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität, manifestiert in Bastardbleichung bzw. Bastardscheckung, ist weit verbreitet für interspezifische Hybriden. Beispiele finden sich unter anderem bei *Trifolium* (Pandey *et al.* 1987; Przywara *et al.* 1989), *Pelargonium* (Metzlaff *et al.* 1982; Pohlheim 1986), *Impatiens* (Arisumi 1985) und *Zantedeschia* (Yao *et al.* 1994; Yao und Cohen 2000). Die Inkompatibilität von Kompartimenten ist jedoch weder auf Zellkern und Plastide, noch auf Pflanzen beschränkt. Dokumentierte Kern-Organellen-Inkompatibilität reicht dabei von Crustaceen bis zu den Säugern. So unterscheiden sich beispielsweise Copepoden verschiedener Populationen in den mitochondriell kodierten Untereinheiten COXI und COXII der Cytochrom c Oxidase und im kernkodierten Cytochrom c (CYC). Hybriden verschiedener Populationen zeigen dabei eine reduzierte Aktivität der Cytochrom c Oxidase (Edmands und Burton 1999). Auch die Kombination von humanen Zellkernen und Mitochondrien aus Primatenzellen zeigten unterschiedliche Raten für die oxidative Phosphorylierung in Abhängigkeit der phylogenetischen Distanz (Kenyon und Moraes 1997).

Interorganelläre Inkompatibilität ist somit keineswegs ein seltenes Phänomen, sondern phylogenetisch weit verbreitet und spiegelt die evolutionäre Einheit der Genome verschiedener Herkunft in der eukaryotischen Zelle wider.

1.2.1 Determinanten von Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität

Eine Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität beruht höchstwahrscheinlich auf gestörten Protein-Protein-, und/oder Protein-Nukleinsäure-Interaktionen. Der oder die molekularen Mechanismen bzw. involvierten Faktoren verbergen sich jedoch hinter einer Vielzahl von möglichen gestörten Interaktionen zwischen den 3.000-4.500 nukleär kodierten Proteinen mit vorhergesagter plastidärer Lokalisierung und den plastidär kodierten Proteinen oder plastidären Nukleinsäuren (Leister 2003; Sun *et al.* 2004).

Alle am Elektronentransport beteiligten Komplexe der Thylakoidmembran sowie die plastidäre F₀F₁-ATPase, aber auch das Schlüsselenzym des Calvin-Zyklus, Rubisco, sind aus sowohl im Kerngenom als auch im Plastom kodierten Untereinheiten zusammengesetzt. Das Gleiche trifft auch auf Komponenten der plastidären Genexpression, wie die plastidär kodierte RNA-Polymerase (PEP) oder die in der

Plastide enthaltenen 70S Ribosomen sowie weitere Enzymkomplexe anderer Funktion zu (Herrmann *et al.* 2003). Somit finden sich praktisch in allen für Chloroplasten essentiellen Komponenten potentielle Auslöser für Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität. Die Relevanz funktionsfähiger Untereinheiten verschiedener Komplexe zeigen Nullmutanten entsprechender Gene, die zum vollständigen Funktionsverlust des jeweils ganzen Enzymkomplexes und in der Folge zu photosynthesedefizienten Phänotypen führen können (Übersichtsartikel: Rochaix 1997). Durch die nicht stöchiometrische Verfügbarkeit einzelner Untereinheiten, beispielsweise durch den Ausfall einer funktionellen Untereinheit, kann die Translationsrate für andere Untereinheiten des jeweiligen Komplexes herabgesetzt werden, was als CES (control by epistasy of synthesis) bezeichnet wird (Wollman *et al.* 1995; Choquet *et al.* 1998). Auch ein selektiver proteolytischer Abbau überflüssiger Untereinheiten wird als weiterer Mechanismus für die Einhaltung korrekter Stöchiometrie postuliert (Übersichtsartikel: Choquet und Vallon 2000).

Neben Protein-Protein Interaktionen sind auch zahlreiche Protein-Nukleinsäure-Interaktionen in Plastiden beschrieben, die für die funktionelle Expression der genetisch kodierten Information essentiell sind. So bedürfen alle plastidären Genexpressionsschritte des koordinierten Zusammenspiels kernkodierter Faktoren mit der DNA oder RNA in Plastiden. Für die Transkription vermitteln beispielsweise kernkodierte Sigmafaktoren die Bindung der PEP an Promotoren. Mutanten in Genen für bestimmte Sigmafaktoren führen zu Phänotypen wie sie für Photosynthesemutanten beschrieben sind (Kanamaru *et al.* 2001, vgl. 1.1.3.1). In Mais konnte die Interaktion eines kernkodierten Faktors mit dem zu spleißenden Transkript gezeigt werden (Till *et al.* 2001). RNA Edierung ist, wie bereits erwähnt, abhängig von nukleären Faktoren (Zeltz *et al.* 1993; Bock und Maliga 1995; Bock und Koop 1997; Hirose und Sugiura 2001; Miyamoto *et al.* 2002; Halter *et al.* 2004; Miyamoto *et al.* 2004; Kotera *et al.* 2005, vgl. 1.1.3.2). Auch die Prozessierung und/oder Stabilisierung regulatorischer Elemente z.B. im 5'-UTR erfolgt durch kernkodierte Faktoren (Zusammenfassungen in: Barkan und Goldschmidt-Clermont 2000; Monde *et al.* 2000; Zerges 2000).

Welche Interaktionen letztendlich Kern-Plastiden-Inkompatibilität auslösen ist unklar. Das Potential dafür sollten aber sämtliche schnell evolvierende Merkmale

besitzen, die bereits zwischen nah verwandten Arten Unterschiede aufweisen. Determinanten für Kern-Plastiden-Inkompatibilität können also vielfältiger Natur sein, da prinzipiell jede Interaktion der Genome der einzelnen Kompartimente gestört sein könnte.

1.2.2 [*Atropa belladonna* (*Nicotiana tabacum*)]-Cybriden als Modell für Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität

Die Untersuchung von Kern-Organellen-Inkompatibilitäten erfordert die Möglichkeit, potentiell inkompatible Kombinationen zu testen. Ideal dafür sind alloplasmatische Linien, also Kombinationen aus einem Nukleus mit fremdem Cytoplasma. Eine Methode alloplasmatische Linien herzustellen, sind Kreuzungsstrategien mit multiplen Rückkreuzungen, die das ursprüngliche Kerngenom sukzessive eliminieren. Eine Voraussetzung hierfür ist die uniparentale Vererbung der cytoplasmatischen Kompartimente. Diese Technik ist aufgrund der in weiteren Verwandtschaftskreisen auftretenden sexuellen Inkompatibilitäten auf nah verwandte Populationen und Arten beschränkt. Neue Techniken haben die Möglichkeiten der Kombination verschiedener Zellkompartimente erweitert. Eine somatische Hybridisierung kann sexuelle Inkompatibilität umgehen und so zu den erwünschten cytoplasmatischen Hybriden (Cybriden) führen.

Die Herstellung pflanzlicher Cybriden beruht meist auf einer durch Polyethylenglykol induzierten Fusionierung von Protoplasten (z.B. Menczel *et al.* 1981), die durch Behandlung kleiner Blattstücke mit Zellulase gewonnen werden (z.B. Gleba *et al.* 1982). Bei nah verwandten Arten tendieren die Zellkerne in den nach der Fusion entstandenen Heterokaryocyten zu fusionieren, was in vielen Fällen einen hybriden Karyotyp mit den vollständigen Chromosomensätzen der beiden Fusionspartner ergibt. Um diesem oftmals unerwünschten Resultat vorzubeugen, besteht die Möglichkeit die Protoplasten des Plastidendonors vor der Fusionierung mit hoch-energetischer γ -Strahlung zu behandeln, was zu Chromosomenbrüchen und in der Folge oftmals zum Verlust der nukleären Chromosomen des Plastidendonors führt. Diese Methode erhöhte die Effizienz Cybriden zu erhalten um ein Vielfaches (Menczel *et al.* 1982). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, Protoplasten des Kerndonors mit Mikroplasten (kernlosen Protoplasten) zu fusionieren (Medgyesy 1994). Für weiter entfernte Arten kann hingegen das Phänomen der nukleären

Segregation in Heterokaryocyten genutzt werden (Gleba und Sytnik 1984). Dabei entmischen sich die Genome der beiden Arten während der Proliferation fusionierter Zellen. Mittels Resistenzmarkern oder aufgrund morphologischer Ausprägung kann auf das gewünschte Kerngenom selektiert werden.

Während für Mitochondrien nachgewiesen wurde, dass sich die Genome in Cybriden von denen der „Eltern“ unterscheiden, also während des Heterokaryocyten-Stadiums Rekombination stattfindet (Belliard *et al.* 1979; Gleba und Sytnik 1984; Zubko *et al.* 2001), konnte dies für Plastidengenome nicht beobachtet werden (z.B. Belliard *et al.* 1978). Auf das entsprechende reinerbige Plastom kann somit ebenfalls durch geeignete Resistenzmarker selektiert werden, oder gegebenenfalls auch auf entsprechende phänotypische Ausprägungen der Cybriden.

Die in dieser Arbeit untersuchten Cybriden aus zwei sexuell inkompatiblen Arten der Familie der Solanaceen besitzen das Kerngenom aus *Atropa belladonna* und das plastidäre Genom aus *Nicotiana tabacum* ([Ab(Nt)]: [Ab]=Kerngenom aus *Atropa belladonna*, [(Nt)]=Plastom aus *Nicotiana tabacum*). Diese Kombination zeigt einen inkompatiblen Phänotyp, der sich in vollständiger Chlorophylldefizienz niederschlägt (Kushnir *et al.* 1991). Plastiden aus Mesophyllzellen dieser [Ab(Nt)]-Cybriden sind im Vergleich zu denen des Tabak Wildtyps kleiner und besitzen kein normal ausgeprägtes Thylakoidmembransystem, jedoch große vesikuläre Strukturen, die ein rudimentäres Membransystem darstellen könnten (Herrmann *et al.* 2003). Neben der Möglichkeit der somatischen Zellhybridisierung machen die vorhandenen Sequenzdaten der Plastidengenome (Shinozaki *et al.* 1986; Schmitz-Linneweber *et al.* 2002), der drastische Phänotyp (Kushnir *et al.* 1991) und die Zugänglichkeit des *N. tabacum* Plastidengenoms für gezielte genetische Modifikation (Svab und Maliga 1993) dieses System ideal zur Untersuchung von Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität.

1.3 Zielsetzung

Pflanzenzellen stellen aufgrund ihrer Entstehung ein integriertes genetisches System dar. Die ehemals autonomen Genome der einzelnen Kompartimente, Nukleus/Cytoplasma, Mitochondrien und Plastiden, werden in hohem Maße koordiniert reguliert und koevolvieren. So erklärt sich, dass einzelne genetische Kompartimente verschiedener Spezies nicht beliebig austauschbar sind. Eine Kombination eines Kerngenoms mit einem fremden Plastidengenom kann den Zusammenbruch der Funktionalität des kompletten Systems nach sich ziehen, wie

am Beispiel der Kombination des nukleären Genoms von *A. belladonna* [Ab] mit dem Plastidengenom von *N. tabacum* [(Nt)] deutlich wird. Diese [Ab(Nt)]-Cybride hat einen albinotischen Phänotyp und kann nur *in vitro* kultiviert werden.

Molekulare Mechanismen bzw. Faktoren einer solchen Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität konnten bislang nicht identifiziert werden, was an der Komplexität möglicher Interaktionen liegt. Den 100 bis 200 Genen eines typischen Plastidengenoms stehen geschätzte 3.000 bis 4.500 kernkodierte, plastidär lokalisierte Proteine gegenüber, von denen ein Großteil mit plastidären Proteinen und/oder Nukleinsäuren interagiert. Prinzipiell könnte jede dieser Interaktionen für ein gestörtes Zusammenspiel der Kompartimente in interspezifischen Kombinationen verantwortlich sein.

Aus diesen Interaktionen galt es diejenigen herauszufiltern, welche in der [Ab(Nt)]-Cybride gestört sind und somit für den Albinismus verantwortlich sind. Mit der Strategie Inkompatibilitätsfaktoren von plastidärer Seite zu identifizieren sollte die Suche auf ein relativ kleines Genom beschränkt werden und gleichzeitig das Problem fehlender nukleärer Sequenzdaten umgangen werden. Im Fokus der Suche solcher Inkompatibilitätsfaktoren sollten dabei schnell evolvierende Bereiche stehen, die von funktioneller Relevanz für die Plastiden und somit für das Gesamtsystem sind.

Die Identifizierung solcher Inkompatibilitätsfaktoren sollte durch eine Kombination klassischer und revers genetischer Ansätze erfolgen. Kritische Nukleotidpositionen bzw. Bereiche innerhalb des Plastidengenoms sollten durch die Analyse von Suppressormutanten identifiziert werden und mit Hilfe von Komplementationslinien bestätigt werden. Die Eliminierung identifizierter Unterschiede durch zielgerichtete Mutagenese des *N. tabacum* Plastidengenoms sollte weiter darüber Aufschluss geben, ob diese Unterschiede tatsächlich für den albinotischen Phänotyp in der [Ab(Nt)]-Cybride verantwortlich sind.

Basierend auf Zwischenergebnissen sollte RNA Edierung hinsichtlich ihres Potentials betrachtet werden, ein genereller Faktor für Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität auch innerhalb naher Verwandtschaftskreise zu sein. Aufschluss darüber sollte die Bestimmung und der Vergleich sämtlicher plastidärer Edierungsstellen (Editotyp) zwischen Arten einer Gattung geben.

Hierzu sollte der Editotyp von *Nicotiana glutinosa* bestimmt werden. Durch einen Vergleich mit dem Editotyp von *Nicotiana tabacum* sollten Unterschiede im Muster plastidärer Edierungsstellen hinsichtlich ihres Potentials Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität auslösen zu können, untersucht werden. Die alloplasmatische Linie *N. tabacum* var. Samsun NN, die eine Kombination des *N. tabacum* Kerngenoms mit dem Plastidengenom von *N. glutinosa* ist, sollte dabei zur Analyse *N. glutinosa* spezifischer Edierungsstellen im fremden Kernhintergrund dienen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und nicht anderweitig spezifizierte Verbrauchsmittel

Hier nicht gesondert aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (München) bezogen. Verbrauchsmaterial in Form von Pipettenspitzen, Reaktionsgefäßen, Kunststoffpetrischalen und Einmalhandschuhen etc. wurden von den Firmen Sarstedt (Nümbrecht), Eppendorf (Hamburg), Peqlab (Erlangen) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

Produkt	Hersteller	
0,6 Micron Gold	Biorad	München
1-Naphtalen-Essigsäure (NAA)	Sigma-Aldrich	München
2X RNA Loading Dye Solution	Fermentas	St. Leon-Rot
6-Aminocaproinsäure	Sigma-Aldrich	München
6-Benzylamino-Purin (BAP)	Sigma-Aldrich	München
$\alpha^{32}\text{P}$ -UTP	GE Healthcare	Freiburg
Accugel; 40% (29:1)	Roth	Karlsruhe
Essigsäure	Sigma-Aldrich, Riedel deHaen	München
Aceton	Roth	Karlsruhe
Agar	Sigma-Aldrich	München
Agarose	Biozym	Hessisch Oldendorf
Ammoniumacetat	Roth	Karlsruhe
APS	Sigma-Aldrich	München
β -Mercaptoethanol	Roth	Karlsruhe
Borsäure	Roth	Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva	Heidelberg
BSA	Roth	Karlsruhe
CaCl_2	Roth	Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blau R-250	Roth	Karlsruhe
CTAB	Roth	Karlsruhe
Cumarsäure	Sigma-Aldrich	München
Dan Chlorix	Colgate Palmolive	Hamburg
Desoxycholat	Roth	Karlsruhe
dNTPs	Roth	Karlsruhe
DTT	Roth	Karlsruhe
EDTA	Roth	Karlsruhe
EGTA	Roth	Karlsruhe
Ethanol	Roth	Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth	Karlsruhe
Formaldehyd	Roth	Karlsruhe
Formamide Loading Dye	GE Healthcare	Freiburg
G26 Kanülen	Dispomed	Gelnhausen
Glycerin	Roth	Karlsruhe
IgG Goat-Anti-Rabbit (whole molecule)-alkalische Phosphatase	Sigma-Aldrich	München
IgG Goat-Anti-Rabbit (whole molecule)-Peroxidase	Sigma-Aldrich	München
H_2O_2	Merck Biosciences	Darmstadt
HALT™ Protease Inhibitor Cocktail	Pierce/Perbio	Bonn
Harnstoff	Roth	Karlsruhe
HCl	Roth	Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth	Karlsruhe
Heparin	Roth	Karlsruhe

Isoamylalkohol	Roth	Karlsruhe
Isopropanol	Roth	Karlsruhe
Kaliumacetat	Roth	Karlsruhe
Luminol	Sigma-Aldrich	München
Macrocarrier	Biorad	München
Maleinsäure	Merck Biosciences	Darmstadt
Methanol	Roth	Karlsruhe
Methylenblau	Roth	Karlsruhe
MgCl ₂	Merck Biosciences	Darmstadt
MgSO ₄	Roth	Karlsruhe
MOPS	Roth	Karlsruhe
MS-Medium + Vitamine	Duchefa Biochemie	Haarlem, NL
Na ₂ CO ₃	Merck Biosciences	Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Roth	Karlsruhe
Natriumacetat	Roth	Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth	Karlsruhe
NaCl	Roth	Karlsruhe
NaH ₂ PO ₄	Roth	Karlsruhe
NaOH	Roth	Karlsruhe
Na ₂ S ₂ O ₃	Merck Biosciences	Darmstadt
NTPs	Fermentas	St. Leon-Rot
Pepton aus Casein	Roth	Karlsruhe
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth	Karlsruhe
PMSF	Pierce/Perbio	Bonn
Polyoxyethylen-10-Tridecyl-Äther	Sigma-Aldrich	München
RbCl ₂	Roth	Karlsruhe
Röntgenfilme	Fuji	Düsseldorf
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Roth	Karlsruhe
Rupture Discs	Biorad	München
Saccharose	Roth	Karlsruhe
Saccharose (Gewegekultur)	Sigma-Aldrich	München
SDS (Natrium-Dodecylsulfat)	Roth	Karlsruhe
Silbernitrat	Roth	Karlsruhe
SLS (Natrium-lauryl-sarcosinat)	Sigma-Aldrich	München
Spermidin	Sigma-Aldrich	München
Stopping Screens	Biorad	München
TEMED	Sigma-Aldrich	München
Tris	Roth	Karlsruhe
Triton X-100	Merck Biosciences	Darmstadt
TRIZOL® Reagent	Invitrogen	Karlsruhe
Trockenmilch	Saliter	Obergünzburg
Tween20	Roth	Karlsruhe

2.1.2 Enzyme

Enzym/Kit	Hersteller	
CIP	Fermentas	St. Leon-Rot
DIG DNA Labeling and Detection Kit	Roche	Mannheim
DNase I	Roche	Mannheim
DYEnamic ET terminator Cycle Sequencing Kit	GE Healthcare	Freiburg
Klenow Fragment	Fermentas	St. Leon-Rot
Omniscript RT Kit	Qiagen	Hilden
OneStep RT-PCR Enzyme Mix	Qiagen	Hilden
pGEM®-T Easy	Promega	Mannheim
Restriktionsenzyme und Puffer	Fermentas und New England Biolabs	St. Leon-Rot und Frankfurt a.M.
RNase A	Qiagen	Hilden
T4-DNA-Ligase	Roche	Mannheim
T7-RNA-Polymerase	Fermentas	St. Leon-Rot
Taq DNA-Polymerase	Qiagen	Hilden

2.1.3 Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller	
Ampicillin	Roth	Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth	Karlsruhe
Cycloheximid	Roth	Karlsruhe
Kanamycin	Serva	Heidelberg
Spektinomycin	Sigma-Aldrich, Fluka	München

2.1.4 Nukleinsäureaufreinigung

Produkt	Hersteller	
GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare	Freiburg
NucleoSpin® Extract II Kit	Macherey-Nagel	Düren
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen	Hilden
RNeasy® Micro Kit	Qiagen	Hilden

2.1.5 Filter und Membranen

Produkt	Hersteller	
Hybond N+ Membran	GE Healthcare	Freiburg
Hybond P Membran	GE Healthcare	Freiburg
Millipore™ MF-Membran Filter, 0,45 µm	Millipore	Schwalbach
Miracloth	Merck Biosciences	Darmstadt
Spritzenvorsatzfiltern, 0,22 µm	Roth	Karlsruhe
Whatman 3MM-Papier	Schleicher & Schuell	Dassel

2.1.6 Oligonukleotide

Die ausnahmslos von MWG-Biotech (Ebersberg) in gefriergetrocknetem Zustand gelieferten Oligonukleotide wurden in sterilem H₂O_{bidest} gelöst. Das Volumen wurde dabei so gewählt, dass eine Stammlösung mit der Konzentration von 100 pmol/µl entstand.

Bezeichnung	Sequenz	Gen	Bemerkung
313for	ACACAGCCCAACCAATTCCC	<i>ndhF</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
313rev	TTAAATGTTGATGGAAGAACC	<i>ycf5</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
5'ndhFfor	AGGTAAGATCCGGTGAATCG	<i>ndhF</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
aadAli59	TGCTGGCCGTACATTTGTACG	<i>aadA</i>	<i>aadA</i> -Kontrolle
aadare	TTGCCAACTACCTTAGTGATC	<i>aadA</i>	<i>aadA</i> -Kontrolle
aadater.for	AAGCGGATGTAACCAATCGG	<i>aadA</i>	<i>atpA</i> -264 Integrationstest (P3)
aadoutrev	ACTGCGGAGCCGTACAAATG	<i>aadA</i>	<i>atpA</i> -264 Integrationstest (P2)
AatpF	TTCGTTTCTTTGGGCCACTG	<i>atpF</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
AbmatKfor	CTTTATCTTCTTTCGAAGGC	<i>matK</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
accDfor	GCTAAATAAATCAATGGGCAG	<i>accD</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
accDfor2	TAATGATCTCGAGGTAATC	<i>accD</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
accDrev	AATGGGATCTAGAGAGACC	<i>accD</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
AndhB	GTCGTTGCTTTTCTTTCTG	<i>ndhB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
AndhD	ACGAATTATTTTCCTTGTT	<i>ndhD</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung

AndhF	CAACGGCAACAAAAAGTTTTCG	<i>ndhF</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
AndhG	GATTTATCTGAACCAATACA	<i>ndhG</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
Aorf74	GATAATACGACTCACTATAGGGCCAGA TATAACACAAAATCTC	<i>ycf3</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
ApetB	ATATGATTGGTTCTGAAGAACG	<i>petB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
ApetD	CAAAAAACCTGACTTGAATG	<i>petD</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
ApsaC	GTATAGACCCAATGTCACAT	<i>psaC</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
ApsbE	AAGCACAGGAGAACGTTTCGT	<i>psbEFL</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
ArpoA	GGATTACAAATAGAGAGAAAT	<i>rpoA</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
ArpoC2	AGCTAAGCCTTATTTGGCCAC	<i>rpoC2</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
Arps14	ATGGCAAGGAAAAAGTTTGAT	<i>rps14</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung, <i>Spinacia</i> Edierung
Arps2	GTCATGGTACTAGGAAATGG	<i>rps2</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
Arps3	GGACAAAAATAAATCCACTTG	<i>rps3</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
AT7accD	GTAATACGACTCACTATAGGGTGATT TCTCTCCGACTAC	<i>accD</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
AT7atpA	GTAATACGACTCACTATAGGGAAATTA CATTAGTAGGAATA	<i>atpA</i>	<i>atpA</i> -264 Mutagenese, <i>atpA</i> -Sonde
AT7atpF	GTAATACGACTCACTATAGGGCTAATG GTACGTAAATGTAACCTC	<i>atpF</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
AT7ndhD	GATAATACGACTCACTATAGGGAATTA ATTCTAACTCCAC	<i>ndhD</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
AT7ndhF	GATAATACGACTCACTATAGGGAAGAG CTAACATCATATAACC	<i>ndhF</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
AT7petB	GATAATACGACTCACTATAGGGACACC TGTTACTATTTT	<i>petB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
AT7petD	GATAATACGACTCACTATAGGGATTAT CAATAGGTAATGTTGC	<i>petD</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
AT7petG	GATAATACGACTCACTATAGGGTTAATT AATCAAAGGTCCAA	<i>petL</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
AT7petL	GATAATACGACTCACTATAGGGAATCT CAATGACAATGAACA	<i>petL</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
AT7psaC	GATAATACGACTCACTATAGGGATTCA CATCTCTTACAACC	<i>psaC</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
AT7psbJ	GATAATACGACTCACTATAGGGTACTA GAGGGATGAACCCAAT	<i>psbEFL</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
AT7psbL	GATAATACGACTCACTATAGGGTCTTA ATTGAAGAAATAATTGGA	<i>psbEFL</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
AT7psbT	GATAATACGACTCACTATAGGGATGAA GAATTATTTACCTTTTTA	<i>psbB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
AT7rpoA	GTAATACGACTCACTATAGGGATTCAA AAGGTCCAACAATGT	<i>rpoA</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
AT7rpoC1	GTAATACGACTCACTATAGGGCAGTAT ACTAGGCCTTCTAA	<i>rpoC1</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
AT7rpoC2	GTAATACGACTCACTATAGGGCTCGCT TCAGATATGAACTTTG	<i>rpoC2</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
AT7rps14	GTAATACGACTCACTATAGGGCCTTAC CAACTTGATCTTGTT	<i>rps14</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung, <i>Spinacia</i> Edierung
AT7rps2	GTAATACGACTCACTATAGGGATTGAG GATATGGCGTCAT	<i>rps2</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
AT7rps3	GATAATACGACTCACTATAGGGATCAA TTTTCGCTCGAATCGT	<i>rps3</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
AT7rps8	GATAATACGACTCACTATAGGGCCAGA TATAACACAAAATCTC	<i>rps8</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
atpAMittefor	GAGATCAGAAGCAAATTGTGC	<i>atpA</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
atpFforP	ATGAAAAACGTAACCGATTTC	<i>atpF</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
atpFrevP	TTGTGCGACTTGATTAATCG	<i>atpF</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
ATPHF5	ACGAAATTAGTAATATTATCC	<i>atpA</i>	<i>atpA</i> -264 Mutagenese, Integrationstest (P1), <i>atpA</i> -Sonde
atpHF6	CGTATATGAGCCTCTTCAA	<i>atpA</i>	<i>atpA</i> -264 Mutagenese
AT7trnW-cca	GCTATTCTAGTATATGCATA	<i>petG</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
CatpAfor	TTATGATGCTCTCCAAACAAGCGC	<i>atpA</i>	<i>atpA</i> -264 Mutagenese
CatpArev	GCGCTTGTTTGGAGAGATCATATAA	<i>atpA</i>	<i>atpA</i> -264 Mutagenese
clpP.AT.2rev	TGAACCGCTACAAGATCAAC	<i>clpP</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
clpP.AT.for	GTAATGATCCATCAACCCGC	<i>clpP</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
clpPex2for	GTGCGACCAGATGTCCATAC	<i>clpP</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
clpPtKo	GGGTTGGTTTAGATTGATCC	<i>clpP</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
cpoB-left	TCCAAAACCTTGAGATAATGGG	<i>rpoB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
Dfabfor1	TTATATGGTTCTAATGAACC	<i>ndhD</i>	<i>Pisum</i> Edierung
Dfabrev1	AAATCCATGAGATATTATTTG	<i>ndhD</i>	<i>Pisum</i> Edierung
EcoatpAfor	TTCCAGAATTCACATTACAATACCTTGC TCC	<i>atpA</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung, <i>atpA</i> -264 Test

EcoatpArev	TTCCAGAATTCTTTCCAAAAGGCGTGA ATGC	<i>atpA</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung, <i>atpA</i> -264 Test
hdhH	CTTTCTACTTATGATCGTCA	<i>ndhG</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
HindatpAfor	TAGCAAGCTTGGGTACAATAGGCATTG CTC	<i>atpA</i>	<i>atpA</i> -264 Mutagenese
HindtrnGrev	TAGCAAGCTTAACCCCTTTCTCAGGA TCC	<i>atpA</i>	<i>atpA</i> -264 Mutagenese
hpl25'rev	CCTCTGGCATTACGACCT	<i>rpl23</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
HpsaAfor	TACTACCACCTGGATCTGGA	<i>psaA</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
HpsaArev2	CCCAAGTTAACTGGTACTT	<i>psaA</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
HpsaB3'rev	CCATGCTAAAGTTTCAATCAA	<i>psaB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
HpsaBfor2	TTTCATTAGAGATTACAATCC	<i>psaB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
hypoMTforP	AGCTAGGACCACTTCCATCG	mitoch.	putative mitochondrielle Edierungsstelle
hypoMTrevP	GGAAGAGAACGAACGTCAGC	mitoch.	putative mitochondrielle Edierungsstelle
K7	AAAAATATCCAAATACCAA	<i>matK</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
Korcula12	TATACAAACAAGAACCAATCC	<i>ndhG</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
muedatpAfor	CTTATAATATACGACGACCCGTCCAAA CAAGCGCAA	<i>atpA</i>	<i>atpA</i> -264 Mutagenese
muedatpArev	CGGGTCGTCGTATATTATAAGAGTGTG TCGTTACAG	<i>atpA</i>	<i>atpA</i> -264 Mutagenese
nb11	TTCATGCTTGTGTTGAGTAATAGC	<i>ndhB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
ndhA.in.rev.RPA	GTAATACGACTCACTATAGGGGTAAAA ACTCCATACAGTTG	<i>ndhA</i>	Cybriden Test
ndhA.nt.ex2.173. rev	TGCTACTAATTCTTCTTCTGCTTCTG	<i>ndhA</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, Solanaceen Edierung
ndhA.nt.in.174. rev	CCTTTTTACTGCAAATTTAGAAGCCG	<i>ndhA</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
ndhA3'rev	CTTGTTTGAGACAAGTCGTG	<i>ndhA</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
ndhAex1for	TGTGTTATCCATATCTCTAC	<i>ndhA</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
ndhAfor	ACAGGAGATACTCGTTTATT	<i>ndhA</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
ndhA_SO_3for	TGCAACAAGATGGACTTTAC	<i>ndhA</i>	<i>Spinacia</i> Edierung
ndhA_SO_3rev	TGACAAATTGTGAATTATAG	<i>ndhA</i>	<i>Spinacia</i> Edierung
ndhB3for	TCTCTTATCCCTAGGAGGTC	<i>ndhB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
ndhBedIII	ATTTCTTGAAGCTCAATCTCTCCCCCG GAT	<i>ndhB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
ndhBfor2	TCATGATCTGGCATGTACAG	<i>ndhB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
ndhBP12	GATATACCAAGAAAGATGTACG	<i>ndhB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
ndhBrev2	CTAAAAAAGGCTATCCTGAGC	<i>ndhB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
ndhd_frev2	CGTGAATATTTTTGGCATTG	<i>ndhD</i>	<i>Spinacia</i> Edierung
ndhDMittefor	AGTACTTGTATGCTTCTAGC	<i>ndhD</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, Solanaceen Edierung, <i>Pisum</i> Edierung
ndhDMitterev	CTAAAGTAGTGATAAATCCTG	<i>ndhD</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
ndhDrev	CTCCATTAAGTCCCGTGTG	<i>ndhD</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, Solanaceen Edierung, <i>Pisum</i> Edierung
ndhDstart5'	GGTCCAAGTGTATCTTGTC	<i>ndhD</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
ndhF.AT.forneu	AAAACCTTCGCCGCATGTGG	<i>ndhF</i>	<i>ndhF</i> Sonde
ndhF.At.revneu	GCATTTCGCTGCAATAGGTCG	<i>ndhF</i>	<i>ndhF</i> Sonde
ndhFforP	GGAACAGACATATGAATATG	<i>ndhF</i>	<i>Nicotiana</i> Edierung
ndhFforP	GGAACAGACATATGAATATG	<i>ndhF</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
ndhFrevP	ATCCCAACATGGAAGTACTG	<i>ndhF</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
ndhG.MP.5'for2	GATTTTATTATTGTGAGCTTTATG	<i>ndhG</i>	Marchantiales Edierung
ndhG.MP.rev2	TCCGAACCAATATGCCTAAC	<i>ndhG</i>	Marchantiales Edierung
ndhH3'for	GGCTGATATTATGACAATACTAGG	<i>ndhA</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, Cybriden Test
ndhIrev	AATAGTTACAGGTAAACGATTTG	<i>ndhA</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
ORF103for2	CACACAATTTAAGTAGATGCG	<i>petL</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
orf31for2	TTAGCGGCTTTAACTATAACC	<i>petG</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
orf99forP	CTTCCAACCTTTGAAAGTACCG	<i>orf99</i>	putative <i>plastidäre</i> Edierungsstelle
orf99revP	TGAGTCGTCAACATGAAAGC	<i>orf99</i>	putative <i>plastidäre</i> Edierungsstelle
P12	GGTCTAATGAGGCTACTATG	<i>ndhB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
P9	GTAATGACAGATCACGGCCAT	<i>ycf3</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
petB3'revP	AATGATTGATTACAAATATTTAG	<i>petB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
petB3=B4for	TGACCCGTTTTTATAGTTTACA	<i>petB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
petBPfor	TTCTGTAAATAGGATCACCC	<i>petB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
petB-Sallrev	TTTTTCGTCGACCTATAAAGGCCCAGA AATAC	<i>petB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
petDrev	AGCCTACATTACATGCAATAG	<i>petB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
petL5'forP	ATTTGAAACTTAGGTAAGTGC	<i>petL</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
prvic	AATTGCACCTATTAAAGCAAC	<i>ndhG</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
psbBR4	GGAACATATGTGGTATGGTT	<i>psbB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
psbH3'for	ATTTTGGAGATTATAATTCTTC	<i>petB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung

psbHforP	AAGATGGCGACTAGGGTTGC	<i>psbH</i>	putative plastidäre Edierungsstelle
psbHrevP	ACCGCAAATAAGGCCATTGC	<i>psbH</i>	putative <i>plastidäre</i> Edierungsstelle
psbL14	TTCTCCGAATGAAATTCAAT	<i>accD</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
rpl20edfor	ATTCGCGAAAGGGGAGTATC	<i>rpl20</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
rpl20for	TATAGCTCGGAGACGTAG	<i>rpl20</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
rpl20rev3	ATTTAAATTATTCTGGTGG	<i>rpl20</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
rpoB3'for	CTCGTTCGAGAACTACGATC	<i>rpoC1</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
rpoBed 3'	TTGAAGATGCGGTACTCAT	<i>rpoB</i>	<i>Spinacia</i> Edierung
rpoBfor	AGGATTTTGTAGGTTTCATTG	<i>rpoB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
rpoBfor2	TCTTTTAGCAGGTAATGGAG	<i>rpoB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
rpoBforP	GGAAAAACAGTAGGGATATGC	<i>rpoB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
rpoBrevP	GAAAAATACCGGATCGCCACC	<i>rpoB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
rpoC15'for	AATAATTTTTCTTCTATGATCG	<i>rpoC1</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
rpoC15'rev	AAATAATCCATCTTTTTCCG	<i>rpoC1</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
rpoC2f2	GATTATTCAGACCTTAATCG	<i>rpoC2</i>	Cybriden Test
rpoC2f2	GATTATTCAGACCTTAATCG	<i>rpoC2</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
rpoC2rev3'	AGGGCCAATTGAATTCCTAAT	<i>rpoC2</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, Cybriden Test
rpoCb4	GGTTCAAATACCCATGGATT	<i>rpoB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung, <i>Spinacia</i> Edierung
rpoCb5	CTGCATTTTCATATTTCCGT	<i>rpoB</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
rps2forP	AATGGAATCCTAAATGGCG	<i>rps2</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
rps2revP	CTGGAATTGAAATATCTGCG	<i>rps2</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
rps8for	AACCTTCTATACGAAATGCTG	<i>rps8</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
ST7forrpl23	GATAATACGACTCACTATAGGGGAATC	<i>rpl23</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
	AAATATGCAG		
Tommunedfor	GATTATCTAACAGTTTAAGTACAGTTGA	<i>ndhA</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung
	TATAG		
trnGUCCfor	CGGGTATAGTTTAGTGGTAA	<i>trnG-UCC</i>	<i>atpA</i> -264 Integrationstest (P4), <i>atpA</i> -Sonde
trnR-for	CACATCCGATTCTTTCTG	<i>atpA</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
WatpAfor	TTATGATGATTGGTCCAAACAAGCGCA	<i>atpA</i>	<i>atpA</i> -264 Mutagenese
	AG		
WatpArev	GCGCTTGTTTGGACCAATCATCATAAA	<i>atpA</i>	<i>atpA</i> -264 Mutagenese
	TG		
ycf4forP	AAGTATGACTTGCGATCAG	<i>ycf4</i>	putative <i>plastidäre</i> Edierungsstelle
ycf4revP	TGTGCACCACAAATAAGAGC	<i>ycf4</i>	putative <i>plastidäre</i> Edierungsstelle
Zagreb5	TAACAGGATTATTAGTTACTCG	<i>ycf5</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
Zagreb6	GAATTTTATTAATAAATGGGAGCG	<i>ndhD</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung
Zagreb7	GCTCCCATTTTTAATAAAATTCC	<i>ndhD</i>	<i>N. glu.</i> Sequenzierung/Edierung, <i>Nicotiana</i> Edierung

2.1.7 DNA- und RNA-Längenstandards sowie Protein-Molekulargewicht-Standards

- DNA: - Lambda-DNA (Fermentas, St. Leon-Rot); (50 ng/μl) *EcoRI*, *HindIII* restringiert
- „GeneRuler™ DNA Ladder“, div. (Fermentas, St. Leon-Rot)
- RNA: - „RiboRuler™ RNA Ladder, High Range“, (Fermentas, St. Leon-Rot)
- “0.24-9.5 Kb RNA Ladder“ (Invitrogen, Karlsruhe)
- Protein: - „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Fermentas, St. Leon-Rot)
- „Low- oder High-Range Rainbow Molecular Weight Markers“ (GE Healthcare, Freiburg)

2.1.8 Geräte

Produkt	Hersteller	
ABI 377 Sequenzierautomat	Applied Biosystems	Darmstadt
Biometra T Gradient PCR-Automat	Biorad	München
Centrifuge T2060 Ultrazentrifuge	Kontron Analytical	Zürich, CH
EM 912 Elektronenmikroskop	LEO	Oberkochen
FujiFilm BAS 1500	Fuji	Düsseldorf
GeneQuant II	GE Healthcare	Freiburg
PDS-1000/He BIOLISTIC® PARTICLE DELIVERY SYSTEM	Biorad	München
Storm860, Phosphorimager	GE Healthcare	Freiburg
Stratalinker® UV Crosslinker	Stratagene	La Jolla, CA, USA
TE 77 PWR Semi-Dry Transfer Unit	GE Healthcare	Freiburg
TLD 58W/25 Leuchtstofflampe	Philipps	Hamburg
TST 41.14 Rotor	Kontron Analytical	Zürich, CH
Vortex Genie2	Scientific Industries, Inc.	Bohemia, NY, USA
Zentrifuge Eppendorf: 5417R	Eppendorf	Hamburg
Zentrifuge Hettich: Mikro22R	Hettich	Tuttlingen

2.1.9 Software

Software	Hersteller	
Bioedit	Ibis Therapeutics	Carlsbad, CA, USA
Chromas	Technelysium Pty Ltd	Tewantin, Qld, AU
Deep View Swiss-PDB Viewer	GlaxoSmithKline R&D und Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)	Brentford, UK und Basel, CH
Pattern Hunter 2.0	Bioinformatics Solutions Inc	Waterloo, ON, Canada
Sequencher 4.X	Gene Codes Corporation	Ann Arbor, MI, USA

2.1.10 Vektoren

- pBluescript II SK (-) Ampr, lacZ', f1ori, PT7, PT3; Stratagene, La Jolla, CA, USA
- pGEM®-T; Promega, Mannheim
- pGV2260 (Deblaere *et al.* 1985)
- pGSFR280 (Block *et al.* 1987)

2.1.11 Bakterienstämme

- *Escherichia coli* DH5α: *gyrA96 recA1 endA1 relA1 thi-1 hsdR17 supE44 deoR*
Δ(lacZYA-argF)U169 Φ80 ΔlacZ ΔM15
- *Agrobacterium tumefaciens* C1Rifr

2.1.12 Pflanzenmaterial

- *Nicotiana tabacum* var. Petit Havanna
- *Nicotiana tabacum* var. Samsun (NN); Abk.: SNN
- *Nicotiana glutinosa*
- *Atropa belladonna*
- *Arabidopsis thaliana* var. Columbia (Col-0)
- *Spinacia oleracea*
- *Pinus sylvestris*
- *Pisum sativum*
- Cybriden und jeweilige Genom- bzw. Plastomdonor Linien: Tab.: 3-1, 3-2 und 3-5

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren

2.2.1.1 Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation folgte der Methode von Birnboim und Doly (1979). Verwendet wurde dabei das modifizierte Protokoll nach Ausubel *et al.* (1987). Die mitisolierte RNA wurde mit RNase A hydrolysiert. Qualitativ hochwertigere, größere Mengen an Plasmid wurden mit Hilfe des „QIAfilter Plasmid Midi Kit“ von Qiagen (Hilden) gewonnen, das die Methode von Birnboim und Doly (1979) mit einer Aufreinigung der erhaltenen Plasmid-DNA über Anionenaustauscher-Säulen kombiniert.

2.2.1.2 DNA-Isolierung aus Pflanzengewebe

Ein ca. 0,5 cm² großes Blattstück wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß unter flüssigem Stickstoff gemörsert, mit 0,6 ml CTAB-Extraktionspuffer versetzt und nach kräftigem Mischen für 30 Minuten bei 60-65°C inkubiert. Nach zweimaliger Chloroformextraktion (siehe 2.2.1.5.1.2) wurden die Nukleinsäuren durch Zugabe des 0,7fachen Volumen Isopropanol und durch Zentrifugation für 30 Min. bei 20.000 x g und 4°C sedimentiert. Optional erfolgte ein Zentrifugationsschritt vor der Isopropanol-

fällung bei 30.000 x g für 20 Minuten bei 4°C, um noch eventuell enthaltene unlösliche Bestandteile zu entfernen. Nach einmaligem Waschen mit 0,7 ml 70%igem Ethanol wurde das getrocknete Sediment, je nach eingesetzter Menge, in 20 bis 100 ml H₂O_{bidest} aufgenommen. Optional kann RNA durch Zugabe von 1 µl RNase A (10µg/ml) und Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur entfernt werden.

CTAB-Extraktionspuffer, pH 8,0

2% CTAB
1,4 M NaCl
100 mM Tris/HCl pH 8,0
20 mM EDTA

2.2.1.3 RNA-Isolierung aus Pflanzengewebe

Die Isolierung von RNA aus pflanzlichem Gewebe erfolgte entweder mittels „TRIZOL[®] Reagent“ der Firma Invitrogen (Karlsruhe), dem Protokoll folgend, oder dem eigentlich für die DNA-Extraktion optimierten CTAB Protokoll (siehe 2.2.1.2) mit anschließender DNase I-Behandlung (Roche, Mannheim). Hierfür wurden entsprechende Reagenzien und Gefäße RNase-frei gemacht durch Sterilfiltration mit Spritzenvorsatzfiltern mit einer Porengröße von 0,22 µm (Roth, Karlsruhe), respektive bei 180°C für mehr als 24 Stunden.

Die Quantifizierung der erhaltenen Nukleinsäuren erfolgte photometrisch (GeneQuant II, GE Healthcare, Freiburg) (Sambrook *et al.* 1989). Die Qualität der isolierten Nukleinsäuren wurde mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.1.6.3) kontrolliert.

2.2.1.4 RNA-Isolierung aus Polysomenfraktionen

Die Isolierung von Polysomen erfolgte modifiziert nach Barkan (1988). 0,4 g Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und unter Stickstoff im Mörser mit dem Pistill zu feinem Pulver zerrieben. Anschließend wurde 1 ml Extraktionspuffer zugegeben und weiter gerieben, bis der Extraktionspuffer wieder vollständig aufgetaut war. Dem Extraktionspuffer wurde vor der Polysomenisolierung frisch Heparin (0,5 mg/ml aus 100 mg/ml Stammlösung), β-Mercaptoethanol (100 mM; 70 µl/10ml), Chloramphenicol (100 µg/ml aus 50 mg/ml Stammlösung in Ethanol) und Cycloheximid (25 µg/ml aus 10 mg/ml Stammlösung) zugesetzt. Die Proben wurden für zehn Minuten auf Eis inkubiert und Zellkerne und unlösliche Bestandteile durch

Zentrifugation für fünf Minuten bei 14.000 x g pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit dem 0,5fachen Volumen 10%iger (w/v) Deoxycholat Lösung versetzt. Nach weiteren fünf Minuten auf Eis wurden die restlichen unlöslichen Bestandteile durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (15 Minuten, 14.000 x g) entfernt. 0,7 ml des Überstandes wurden auf 10 ml eines analytischen Saccharosegradienten geladen. Für Kontrollexperimente wurde der Überstand mit EDTA (20 mM aus 0,5 M Stammlösung) behandelt, was zur Dissoziation der mRNA-Ribosomen-Komplexe führt. Zusätzlich wurde im 10x Polysomengradienten Puffer 0,1 M MgCl₂ durch 0,1 M EDTA ersetzt. Die Gradienten wurden in einem TST 41.14 Rotor mit 35.000 U./min. bei 4°C in einer „Centrikon T2060“ Ultrazentrifuge (Kontron Analytical, Zürich, CH) zentrifugiert, im Anschluss in 1 ml Schritten von oben nach unten mit einer 1 ml Automatikpipette fraktioniert und mit 120 µl 5% SDS/0,2 M EDTA-Lösung versetzt, um die RNA-Protein-Komplexe zu dissoziieren. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe 2.2.1.5.1.1). Die erhaltene wässrige Phase wurde mit dem 0,7fachen Volumen Isopropanol gefällt und bei Raumtemperatur und 20.000 x g präzipitiert. Nach einem Waschschrift mit 70%igem Ethanol wurde das Nukleinsäurepellet in 20 µl Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert. Für Northernanalysen (siehe 2.2.1.6.4) wurden 5 µl eingesetzt. Für die cDNA-Synthese wurden 5 µl ausgewählter Fraktionen mit dem „RNeasy® Micro Kit“ (Qiagen, Hilden) inklusive DNase I-Behandlung aufgereinigt und die RNA im Anschluss mit 20 µl eluiert. Es folgte eine weitere DNase I-Behandlung (siehe 2.2.1.7.2). 1 µl aus den dabei erhaltenen 16 µl wurde zur cDNA-Synthese mittels „QIAGEN OneStep RT-PCR Kit“ (Qiagen, Hilden) eingesetzt (siehe 2.2.1.7.3.2).

Extraktionspuffer

0,2 M Tris/HCl, pH 9
 0,2 M KCl
 35 mM MgCl₂
 25 mM EGTA
 0,2 M Saccharose
 1% Triton X-100
 2% Polyoxyethylen-10-Tridecyl-Äther

10x Polysomengradienten Puffer

0,4 M Tris/HCl, pH 8
 0,2 M KCl
 0,1 M MgCl₂

Analytischer Saccharosegradient (10 ml)

2,5 ml 55% Stammlösung
 2,5 ml 40% Stammlösung
 2,5 ml 30% Stammlösung
 2,5 ml 15% Stammlösung

Saccharosegradient Stammlösungen 30 ml	15%	30%	40%	55%
70% Saccharose	6,4 ml	13 ml	17 ml	24 ml
10x Polysomengradienten Puffer	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
H ₂ O	20,5 ml	14 ml	10 ml	3,3 ml
Heparin 100 mg/ml	150 µl	150 µl	150 µl	150 µl
Chloramphenicol (50 mg/ml in Ethanol)	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl
Cycloheximid (10 mg/ml)	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl

2.2.1.5 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

2.2.1.5.1 Organische Lösungsmittel

2.2.1.5.1.1 Phenolextraktion

Die Entfernung von Proteinen aus nukleinsäurehaltigen Lösungen wurde mittels Zugabe des gleichen Volumens Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Zusammensetzung: 25 Teile Phenol, 24 Teile Chloroform, 1 Teil Isoamylalkohol; Roth, Karlsruhe) bewerkstelligt. Nach kräftigem Mischen folgte eine Zentrifugation bei Raumtemperatur und 10.000 x g für 10 Minuten. Die obere wässrige Phase enthält die gelösten Nukleinsäuren. Dieser Schritt kann nach Überführung der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß wiederholt werden.

2.2.1.5.1.2 Chloroformextraktion

Die Chloroformextraktion kann zur weiteren Reinigung nach einer Phenolextraktion (siehe 2.2.1.5.1.1) dienen oder auch zur Entproteinisierung bei diversen Nukleinsäureisolierungsmethoden, deren Reagenzien nicht kompatibel mit Phenolextraktionen sind, beispielsweise wenn diese PVP enthalten. Verfahren wurde wie bei einer Phenolextraktion nur mit einer Mischung aus Chloroform und Isoamylalkohol (Zusammensetzung: 24 Teile Chloroform, 1 Teil Isoamylalkohol). Die gelösten Nukleinsäuren befinden sich in der oberen wässrigen Phase. Dieser Schritt wurde gegebenenfalls wiederholt.

2.2.1.5.2 Fällung von Nukleinsäuren

2.2.1.5.2.1 Natriumacetatfällung

Nach Zugabe des 0,1fachen Volumen 3 M Natriumacetat und dem 2,5fachen Volumen an Ethanol_{abs} erfolgte eine kurze Inkubationszeit auf Eis mit anschließender halbstündiger Zentrifugation bei 20.000 x g und 4°C. Die präzipitierten Nukleinsäuren wurden mit 750 ml 70%igem Ethanol gewaschen und nochmals zehn Minuten bei 20.000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde ausschließlich in H₂O_{bidest} rückgelöst.

2.2.1.5.2.2 Ammoniumacetatfällung

Um kurzkettige Nukleinsäuremoleküle, wie beispielsweise PCR-Primer, welche nachfolgende Reaktionen stören könnten, zu entfernen, wurde die Ammoniumacetatfällung eingesetzt. Hierbei wurden die Nukleinsäuren mit dem einfachen Volumen 4,5 M Ammoniumacetat und dem sechsfachen Volumen Ethanol_{abs} präzipitiert. Die Zentrifugations- und Waschschrte erfolgten wie für die Natriumacetatfällung beschrieben (siehe 2.2.1.5.2.1).

2.2.1.5.3 DNA-Aufreinigung mit nukleinsäurebindenden Säulen

Alternativ zu oben aufgeführten Aufreinigungen (Entproteinisierung, Pufferwechsel, Primerentfernung etc.) mittels organischer Lösungsmittel und/oder Fällungen (siehe 2.2.1.5.1 und 2.2.1.5.2), wurden Nukleinsäuren je nach Verwendungszweck mit kommerziell erhältlichen DNA-bindenden Säulen inklusive Puffersystemen aufgereinigt.

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten für eine anschließende Sequenzierung (siehe 2.2.1.7.9) fand das „NucleoSpin® Extract II Kit“ von Macherey-Nagel (Düren) Verwendung. Sollten die PCR-Produkte oder Restriktionsfragmente für Klonierungen verwendet werden, wurde ausschließlich das „GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ von GE Healthcare (Freiburg) verwendet.

Beide Systeme folgen dem gleichen Prinzip, wobei in Anwesenheit eines chaotropen Reagenzes Nukleinsäuren an die entsprechende Matrix gebunden und nach Reinigungsschritten mittels schwach ionischer Puffer oder Wasser eluiert werden.

Der pH-Wert für die Elution sollte dabei Idealerweise im leicht alkalischen Bereich bei pH 8-8,5 liegen.

2.2.1.5.4 DNA-Eluierung aus Agarosegelen

Zur Eluierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen im Anschluss an eine PCR (siehe 2.2.1.7.1) und/oder eine Restriktion (siehe 2.2.1.7.4) wurden die gewünschten Fragmente ausgeschnitten und mit Hilfe des „GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ von GE Healthcare (Freiburg) aufgereinigt (siehe auch 2.2.1.3.5).

2.2.1.6 Elektrophorese-, Transfer- und Nachweistechiken von Nukleinsäuren

2.2.1.6.1 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der DNA nach Isolierung, PCR oder Restriktion, wurde diese mit dem jeweils 0,25fachen Volumen 5x Auftragspuffer versetzt und je nach Größe der zu erwartenden Fragmente in 0,8 bis 2%igen TBE-Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe in die DNA interkalierenden Ethidiumbromids, welches unter UV-Licht fluoresziert. Die Ethidiumbromidkonzentration im Gel bzw. der Färbelösung betrug 0,5 µg/ml.

10x TBE (Tris-Borat-EDTA)

0,89 M Tris/HCl
0,89 M Borsäure
20 mM EDTA

10x Auftragspuffer

4 M Harnstoff
50% Saccharose
50 mM EDTA pH 7
0,1% Bromphenolblau

2.2.1.6.2 DNA-Transfer auf Nylonmembranen („Southern-Blot“)

Für die Analyse von Plastidengenom-spezifischen DNA-Fragmenten mittels spezifischer Sonden wurden ca. 10 µg isolierte pflanzliche Gesamt-DNA (siehe 2.2.1.2) restringiert (siehe 2.2.1.7.4), im Anschluss daran die Fragmente in einem Agarosegel ihrer Größe entsprechend aufgetrennt und der Gellauf durch Ethidiumbromidfärbung des Gels (siehe 2.2.1.6.1) überprüft. Zur Erhöhung der

Transfereffizienz großer Moleküle erfolgte eine zehnminütige Inkubation des Gels in 0,2 N HCl was zur partiellen Depurinierung der DNA-Moleküle führt. Nach zweimaligem Waschen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ erfolgten zwei 20minütige Denaturierungsschritte in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl-Lösung und zwei Waschschrte in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$. Nach der Neutralisierung in 1 M Tris pH 7,5 mit 1,5 M NaCl wurde das Gel für einige Minuten in 5 x SSC Puffer äquilibriert und ebenfalls in diesem Puffer mittels Kapillartransfer (Southern 1975) die im Gel aufgetrennten Nukleinsäuremoleküle über Nacht auf eine „Hybond N+ Membran“ (GE Healthcare, Freiburg) überführt (Sambrook *et al.* 1989). Die transferierten Nukleinsäuren wurden mittels eines „Autocrosslinkers“ (Stratagene, La Jolla, CA, USA) mit UV-Licht ($2.000 \times 100 \mu\text{J}/\text{cm}^2$), anschließendem zehnminütigen Backen bei 80°C und abermaliger Behandlung mit UV-Licht ($1.200 \times 100 \mu\text{J}/\text{cm}^2$) auf der Membran fixiert. Die so präparierte Membran kann entweder trocken aufbewahrt oder direkt hybridisiert werden (siehe 2.2.1.6.7).

20x SSC, pH 7,0 (HCl)

3 M NaCl
0,3 M Na-Citrat

2.2.1.6.3 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

5-10 μg isolierte Gesamt-RNA wurde mit dem gleichen Volumen 2x Auftragspuffer (Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt und zehn Minuten bei 70°C denaturiert. Gegebenenfalls wurden die Proben mit Ethidiumbromid (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) versetzt. Die Auftrennung der RNA-Moleküle ihrer Größe entsprechend, erfolgte in 1,2%igen MOPS-Formaldehydgelen. Für einen Ansatz von 120 ml Gel wurden 1,4 g Agarose in 90 ml Wasser aufgekocht und nach Abkühlen auf ca. 60°C 12 ml 10x MOPS-Puffer sowie 20 ml 37%iges Formaldehyd zugegeben. Der Gellauf erfolgte in Laufpuffer bei fünf bis zehn Volt pro Zentimeter Gellänge. Visualisiert werden konnten prominente RNA-Moleküle durch Färbung des Gels für 15 Minuten in wässriger Ethidiumbromidlösung (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

10x MOPS-Puffer (pH 7,2)

200 mM MOPS
80 mM Natriumacetat
10 mM EDTA

Laufpuffer

1x MOPS-Puffer
0,1 Vol. Formaldehyd

2.2.1.6.4 RNA-Transfer auf Nylonmembranen („Northern-Blot“)

Der Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten RNA-Molekülen auf Nylonmembranen („Hybond N+ Membran“, GE Healthcare, Freiburg) erfolgte durch Kapillarkraft über Nacht in 5x SSC-Puffer, wie in Abschnitt 2.2.1.6.2 beschrieben. Ebenfalls wie in Abschnitt 2.2.1.6.2 beschrieben, erfolgte die Fixierung der Nukleinsäuremoleküle auf der Membran mittels UV-Licht und Hitzebehandlung. Je nach Anwendung wurde die Membran zur Kontrolle eines vollständigen Transfers der RNA mit Methylblau gefärbt. Die Inkubation in der Färbelösung erfolgte für ca. 30 Sekunden gefolgt von mehreren Waschschritten unter fließendem Wasser zur Entfärbung.

Methylblau Färbelösung, pH 5,2

0,03% Methylblau
0,3 M Natriumacetat

2.2.1.6.5 Herstellung radioaktiver strangspezifischer RNA-Sonden mittels *in vitro*-Transkription

Zur Herstellung strangspezifischer Sonden wurde zunächst eine PCR auf Gesamtzell-DNA oder -cDNA des entsprechenden Organismus durchgeführt, welche entgegen der Transkriptionsrichtung eine T7-Promotorsequenz einführt. Das Amplifikat wurde für die folgende *in vitro* Transkription mittels T7-RNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) mit dem „GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ von GE Healthcare (Freiburg) aufgereinigt. Die Markierung der Sonde erfolgte durch den Einbau von radioaktiv markiertem $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP (GE Healthcare, Freiburg) während der zweistündigen *in vitro* Transkription bei 37°C.

***in vitro* Transkriptionsansatz (20 µl)**

	Endkonzentration	Volumen
5x T7 Puffer	1x	4 µl
10 mM ATP, GTP, CTP Mix	0,5 mM	1 µl
100 µM UTP	0,012 mM	2,4 µl
$\alpha^{32}\text{P}$ -UTP	50 µCi	5 µl
Template	0,2-1 µg	x
T7 Polymerase	20 U	1 µl
H ₂ O	ad 20 µl	y

2.2.1.6.6 Herstellung nicht-radioaktiver DNA-Doppelstrangsonden mittels PCR

Die Herstellung von nicht-radioaktiven DNA-Doppelstrangsonden zur Hybridisierung, sowohl auf DNA als auch auf RNA-Membranen, erfolgte mittels PCR (siehe 2.2.1.7.1). Die Grundlage der nicht-radioaktiven Detektion bilden Digoxigenin markierte Nukleotide (DIG-11-dUTP; Roche, Mannheim), welche wiederum immunologisch durch Anti-DIG-Antikörper detektiert werden und mit Hilfe des daran gekoppelten Enzyms, in diesem Fall alkalischer Phosphatase (AP), durch Umsetzung (Dephosphorylierung als Initialschritt) eines Substrates visualisiert werden (wahlweise chemilumineszente oder kolorimetrische Detektion).

Es wurde dem Protokoll des „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ (Roche, Mannheim) gefolgt. Die Standard-Desoxynukleotidmischung für die PCR (siehe 2.2.1.7.1) wurde durch „DIG DNA Labeling Mix“ (Roche, Mannheim) ersetzt. Als Template für einen 25 µl Ansatz diente 1 µl spezifisches PCR Produkt, welches mit den entsprechenden Primern vorher hergestellt wurde, wobei diese PCR (siehe 2.2.1.7.1) jeweils auf Gesamtzell-DNA oder cDNA des entsprechenden Organismus durchgeführt wurde.

2.2.1.6.7 Sondenhybridisierung und Detektion auf DNA- oder RNA-Membranen

2.2.1.6.7.1 Hybridisierung und Detektion radioaktiver strangspezifischer RNA-Sonden

Nach Prähybridisierung der Membran bei 65°C in 20 ml „Church-Buffer“ für ca. eine Stunde wurde die Sonde, d.h. der gesamte Transkriptionsansatz (siehe 2.2.1.6.5), nach zehnminütiger Denaturierung bei 100°C, zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht, ebenfalls bei 60-65°C. Es folgten fünf Waschschrte bei entsprechender Hybridisierungstemperatur mit jeweils sinkender SSC-Konzentration (2x; 1x; 0,5x; 0,2x; 0,1x SSC, hergestellt aus 20x SSC Stammlösung, siehe 2.2.1.6.2) und jeweils 0,1% (w/v) SDS. Zur Detektion der Signale wurden Phosphoimagersysteme der Firmen Fuji (Düsseldorf, „FujiFilm BAS 1500“) oder GE Healthcare (Freiburg, „Storm860“) verwendet.

„Church-Buffer“
0,5 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,2
1 mM EDTA
7% SDS w/v

2.2.1.6.7.2 Hybridisierung und Detektion nicht-radioaktiver DNA-Doppelstrangsonden

Die Hybridisierung folgte dem Protokoll des „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ (Roche, Mannheim). Die Membran (siehe 2.2.1.6.2 und 2.2.1.6.4) wurde 30 Minuten bei 65°C in 20 ml Hybridisierungspuffer mit 500 µl Lachsspermalösung, das vor Zugabe fünf Minuten gekocht wurde, prähybridisiert. Für die Hybridisierung wurde der gesamte PCR-Ansatz (siehe 2.2.1.6.6), nach Kontrolle eines Aliquots auf einem Agarosegel (siehe 2.2.1.6.1), in 20 ml Hybridisierungspuffer gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 60-65°C über Nacht. Nach zwei fünfminütigen Waschschritten mit 2x SSC/0,1% SDS bei Raumtemperatur folgten zwei Waschschrritte mit erhöhter Stringenz mit 0,2x SSC/0,1% SDS bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur für jeweils 15 Minuten. Nachdem die Membran kurz mit Waschpuffer gespült wurde, folgte der immunologische Nachweis. Hierfür wurde die Membran für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Blockierlösung behandelt. Die halbstündige Antikörperinkubation mit „Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments“ erfolgte wie alle weiteren Schritte ebenfalls bei Raumtemperatur. Die Verdünnung des Antikörpers richtete sich dabei nach der folgenden Detektionsmethode. Für die kolorimetrische Variante mit NBT/BCIP (Roche, Mannheim) wurde eine 1:10.000 Verdünnung in Blockierlösung gewählt. Für den Chemilumineszenznachweis mittels CDP-Star (Roche, Mannheim) wurde der Antikörper 1:20.000 verdünnt. Vor der Detektion wurde die Membran noch zweimal für 15 Minuten in Waschpuffer gewaschen und im Anschluss daran zweimal fünf Minuten in Detektionspuffer äquilibriert. Die Detektion mittels NBT/BCIP (Roche, Mannheim; 1:50 verdünnt in Detektionspuffer) erfolgte durch direkte Färbung der Membran. An den Anti-DIG-Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase dephosphoryliert BCIP, das in dieser Form NBT reduziert, welches hierdurch einen blauen, unlöslichen Farbstoff ausbildet. CDP-Star wurde 1:100 verdünnt in Detektionspuffer verwendet. Die Dephosphorylierung des Chlor-substituierten 1,2-Dioxetans führt zur Entstehung des instabilen Phenolat Anions, unter dessen Zerfall Licht emittiert wird, welches mit Hilfe von Röntgenfilmen detektiert wurde.

Blockier-Reagenz Stammlösung

10% (w/v) Blockier-Reagenz in Maleinsäurepuffer**Blockierlösung (frisch)**

1% (w/v) Blockier-Reagenz in Maleinsäurepuffer aus
Blockier-Reagenz Stammlösung**Detektionspuffer pH 9,5**

0,1 M Tris
0,1 M NaCl**Hybridisierungspuffer**

5x SSC aus 20x SSC Stammlösung (siehe 2.2.1.6.2)
0,1% (w/v) Blockier-Reagenz aus 1% (w/v) Blockier-
Reagenz in Maleinsäurepuffer
0,1% (w/v) SLS
0,2% (w/v) SDS**Lachsspermalösung**

10 µg/ml
nach dem Lösen zehnmal mit G26 Kanüle scheren**Maleinsäurepuffer, pH 7,5**

0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl**Waschpuffer**

Maleinsäurepuffer
0,3% (v/v) Tween20

2.2.1.7 Amplifikation und enzymatische Modifizierung von Nukleinsäuren

2.2.1.7.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation genomischer DNA sowie cDNA diente die Polymerasekettenreaktion (PCR, engl. Polymerase Chain Reaction). Dazu wurden in einen 50 µl Ansatz ca. 5 ng DNA, 5 µl 10x Taq DNA-Polymerasepuffer inklusive 15 mM MgCl₂ (Qiagen, Hilden), 5 µl 2 mM dNTP Mischung (Roth, Karlsruhe), sowie je 10 pmol der entsprechenden Primer (MWG-Biotech, Ebersberg), die das zu amplifizierende Fragment flankieren, hinzugefügt. Nach Zugabe von 2,5 Einheiten Taq-DNA-Polymerase (Qiagen, Hilden) erfolgte die Reaktion in einem PCR-Automaten („Biometra T Gradient“, Biometra, Göttingen) mit folgenden Zyklen: 94°C, 30 Sek.; 48-60°C (je nach Schmelztemperatur der Primer), 30 Sek.; 72°C, eine Minute pro Kbp des zu amplifizierenden Fragments. Voran ging jeweils ein fünfminütiger Denatu-

rierungsschritt bei 94°C; abgeschlossen wurde die PCR durch einen fünfminütigen Elongationsschritt bei 72°C. Die Anzahl der Zyklen variierte zwischen 28 und 38.

2.2.1.7.2 Enzymatische Hydrolyse von DNA mittels DNase I

Je nach Isolierungsmethode der RNA (siehe 2.2.1.3 und 2.2.1.4) kann noch DNA enthalten sein, welche vor einer reversen Transkription (siehe 2.2.1.7.2) zunächst mittels DNase I entfernt werden muss. Dazu wurden ca. fünf bis zehn µg RNA mit H₂O_{bidest} auf ein Volumen von 175 µl aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte bei 37°C nach Zugabe von 40 Einheiten DNase I (Roche, Mannheim) und 20 µl 10 x DNase I-Puffer. Nach anschließender zweimaliger Phenol- und einmaliger Chloroformextraktion (siehe 2.2.1.5.1) wurde eine Natriumacetat-Ethanol-Fällung (siehe 2.2.1.5.2.1) der Nukleinsäuren über Nacht bei -20°C durchgeführt. Das erhaltene RNA-Sediment wurde in 16 µl Wasser rückgelöst.

10x DNase I-Puffer
400 mM Tris/HCl pH 7,5
100 mM MgCl ₂

2.2.1.7.3 cDNA-Synthese

2.2.1.7.3.1 Gesamt-cDNA: reverse Transkription mit Zufallshexaoligonukleotiden

Zunächst wurden 14 µl der nach der DNase I-Behandlung (siehe 2.2.1.7.2) erhaltenen RNA fünf Minuten bei 70°C im Beisein von Zufallshexaoligonukleotiden (10 pmol), welche als Primer für die Erststrangsynthese dienen, denaturiert. Die Zugabe des Enzyms, des Puffers und der Nukleotide („Omniscript RT Kit“; Qiagen, Hilden) erfolgte auf Eis, um einer Wiederausbildung etwaiger Sekundärstrukturen der RNA vorzubeugen. Die Erststrangsynthese erfolgte für eine Stunde bei 37°C.

Reaktionsansatz (40 µl)
14 µl RNA, DNase I-behandelt (siehe 2.2.1.7.2)
1 µl Zufallshexaoligonukleotide (10 pmol)
4 µl 10x Puffer
4 µl dNTPs (5mM)
2 µl Reverse Transcriptase „Omniscript“ (4U/µl)
ad 40 µl H ₂ O

2.2.1.7.3.2 cDNA mit genspezifischen Primern

Als Template wurde 1 µl der DNase I-behandelten RNA (siehe 2.2.1.7.2) eingesetzt. Verwendet wurde das „QIAGEN OneStep RT-PCR Kit“ (Qiagen, Hilden). Der „OneStep RT-PCR Enzyme Mix“ enthält neben zwei verschiedenen Enzymen für die reverse Transkription, welche für eine halbe Stunde bei 50°C in einem PCR-Automaten („Biometra T Gradient“, Biometra, Göttingen) stattfindet, auch bereits eine „HotStarTaq“ für die direkt im Anschluss an die reverse Transkription folgende PCR (siehe 2.2.1.7.1). Ein 15minütiger Denaturierungsschritt aktiviert die Taq-Polymerase, während gleichzeitig die Reversen Transkriptasen inaktiviert werden. Der Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

Reaktionsansatz (25µl)

1 µl RNA, DNase I-behandelt
je 1,5 µl Primer (Stammlösung: 10 pmol/µl)
5 µl 5x Puffer
1 µl dNTPs (10mM)
1 µl „OneStep RT-PCR Enzyme Mix“
ad 25 µl H₂O

2.2.1.7.4 Restriktionsanalyse

Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Fermentas (St. Leon-Rot), NEB (Frankfurt a.M.) oder GE Healthcare (Freiburg) bezogen. Die Wahl des entsprechenden Reaktionspuffers, sowie die Durchführung der Reaktion inklusive Hitzedenaturierung des Enzyms erfolgte nach Vorschrift des Herstellers. Die eingesetzte Enzymmenge hing dabei jeweils von der eingesetzten Menge DNA ab.

2.2.1.7.5 Umwandlung kohäsiver in glatte Enden von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I (Fermentas, St. Leon-Rot) können kohäsive Enden in glatte umgewandelt werden. Überhängende 3'-Enden werden durch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität entfernt. Dies wurde durch Inkubation der entsprechenden DNA mit fünf Einheiten des Enzyms für eine halbe Stunde bei 37°C bewerkstelligt. Zum Auffüllen von 5'-Überhängen nutzt man die 5'-3'-Polymeraseaktivität. Hierzu erfolgte die Inkubation der DNA mit fünf Einheiten des Enzyms für 15 Minuten bei 37°C unter Anwesenheit von je 1mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP.

2.2.1.7.6 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Zur Erhöhung der Effizienz von Klonierungen kann mittels Dephosphorylierung der linearisierten Vektor-DNA eine Selbstligation dieser Moleküle verhindert werden. Hierfür wurde eine Enzymeinheit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP; Fermentas, St. Leon-Rot) eingesetzt. Die Reaktion erfolgte im jeweiligen Restriktionsansatz oder, bei bereits aufgereinigtem, geschnittenen Vektor, in „Y⁺/Tango™-Puffer (Fermentas, St. Leon-Rot). Um die folgende Ligation (siehe 2.2.1.7.7) mit dem entsprechenden Insert nicht zu beeinträchtigen, wurde das Enzym durch zwei Phenol- und eine folgende Chloroformextraktion mit anschließender Natriumacetat-Ethanol-Fällung der Nukleinsäure entfernt (siehe 2.2.1.5.1 und 2.2.1.5.2.1).

2.2.1.7.7 Ligation

Die Ligation erfolgte nach der Formel:

$$\frac{\text{ng Vektor} \times \text{Kb Insert}}{\text{Kb Vektor}} \times \text{Insert / Vektor (molares Verhältnis)}$$

Für eine Ligation eines ungefähr 3 Kbp großen Vektors und eines 0,5 Kbp großen Inserts wurde ein molares Verhältnis von Insert zu Vektor von drei zu eins zu Grunde gelegt. Die eingesetzte Menge an Vektor-DNA belief sich auf 50-100 ng. Der Reaktionsansatz mit zwei bis drei Einheiten T4-DNA-Ligase im entsprechenden Puffer (Roche, Mannheim), erfolgte in einem Wasserbad, das über Nacht von Raumtemperatur langsam auf 4°C abkühlte.

2.2.1.7.8 Klonierung von PCR-Produkten

Die Klonierung von PCR-Produkten (siehe 2.2.1.7.1) kann über (mittels Primern eingeführten) Restriktionsschnittstellen erfolgen. Alternativ wurden PCR-Produkte „TA“ kloniert. Hierbei macht man sich die Eigenschaft der Taq-Polymerase zu Nutze, einzelne, nicht-spezifische Adenosinnukleotide am 3'-Ende anzuhängen. Falls Polymerasen verwendet wurden, die diese Eigenschaft nicht besitzen, wurde im Anschluss an die PCR (siehe 2.2.1.7.1) der Ansatz unter Zugabe von 2,5 Einheiten Taq-DNA-Polymerase (Qiagen, Hilden) und dATP (0,2 mM Endkonzentration) für 20

Minuten bei 72°C inkubiert. Der entsprechende linear vorliegende Vektor muss hierfür an beiden Enden einen 3'-Thymidin Überhang vorweisen. Entsprechende Vektoren sind kommerziell erhältlich (hier verwendet: „pGEM®-T Easy“; Promega, Mannheim) oder wurden durch Insertion eines 31 Bp langen Oligonukleotids (5'-AAG CTTCCCATGGGCGCCATGTCATGAGTGG-3') über die *Sma*I und *Pst*I Schnittstelle in pBluescript SK II(-) (Stratagene, Heidelberg) und anschließender Restriktion mit *Xcm*I hergestellt.

2.2.1.7.9 Automatische DNA-Sequenzierung nach Sanger *et al.* (1977)

Die hier angewandte Technik beruht auf der Kettenabbruchmethode (beschrieben in Sanger *et al.* 1977). Sequenziert wurden PCR-Produkte, die entweder durch Ammoniumacetatfällung (siehe 2.2.1.5.2.2), durch Aufreinigung über DNA-bindende Säulen (siehe 2.2.1.5.3) oder durch Gelaufreinigung (siehe 2.2.1.5.4) für eine folgende Sequenzierung aufbereitet wurden. Eingesetzt wurden ca. 10 ng pro Kb zu sequenzierender DNA und 0,5 pmol des jeweiligen Primers. Für die Sequenzierung von Plasmiden wurden ca. 0,5-1 µg DNA eingesetzt. Die Sequenzreaktion erfolgte nach Zugabe von 2 µl „Sequenziermix“ („DYEnamic ET terminator Cycle Sequencing Kit“; GE Healthcare, Freiburg) in einem Volumen von 10 µl nach einem zyklischen Sequenzierverfahren: 2 Min. 95°C; 26 Zyklen (10 Sek., 95°C; 5 Sek., 50°C; 4 Min., 60°C) in einem „Biometra T Gradient“ PCR-Automaten (Biometra, Göttingen).

Im Anschluss daran wurden die Produkte nach Zugabe von 26 µl H₂O_{bdest.} mit 64 µl Ethanol_{abs.} gefällt, um freie Terminatoren zu entfernen. Nach 20minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine 20minütige Zentrifugation bei 4°C mit 20.000 x *g* und ein fünfminütiger Waschschriff mit 195 µl 70%igem Ethanol. Die präzipitierten Reaktionsprodukte wurden in 3 µl „Formamide Loading Dye“ (GE Healthcare, Freiburg) resuspendiert.

Die Analyse der Sequenzierprodukte erfolgte nach deren Auftrennung in einem 48 cm langen, 0,2 mm dicken und 6,3%igen denaturierenden Polyacrylamidgel mit einem ABI 377 Sequenzierautomaten (Applied Biosystems, Darmstadt).

Sequenzgel, 6,3%

18 g Harnstoff
22,8 ml H₂O
5,33 ml Accugel; 40% (29:1)
6 ml 10x TBE (siehe 2.2.1.6.1)
filtrieren (Millipore MFTM-Membran Filter, 0,45 µm), entgasen
300 ml 10%iges APS
20 ml TEMED

Die Auswertung und Bearbeitung der erhaltenen Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe folgender Software oder online verfügbaren Programmen:

- BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)
- Bioedit 5.0.9 (<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/BioEdit/Bioedit.html>)
- Chromas 1.62 (<http://www.technelysium.com.au>)
- Sequencher 4.6 (<http://www.genecodes.com>)

2.2.2 Methoden zur Analyse von Proteinen

2.2.2.1 Proteinextraktion und Mengenbestimmung

2.2.2.1.1 Extraktion und Fraktionierung von Gesamtprotein aus Blattgewebe

Gesamtprotein aus pflanzlichem Gewebe wurde durch mechanischen Zellaufschluss mittels Mörser und Pistill in Homogenisationspuffer isoliert. Eine Gewebeprobe von ca. 0,1-0,2 g wurde in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zerrieben, welches in ca. 1 ml Homogenisationspuffer aufgenommen wurde. Die so aufbereiteten Proben wurden direkt in eine „SDS-PAGE“ (siehe 2.2.2.2.1) eingesetzt, oder bei -20°C oder -70°C aufbewahrt.

Homogenisationspuffer

40 mM β-Mercaptoethanol
10% Saccharose
100 mM Tris/HCL; pH 7,2
5 mM EDTA
5 mM EGTA

Zur Stabilisierung der isolierten Proteine wurde ggf. PMSF (1 mM) und „HALTTM Protease Inhibitor Cocktail“ (beides Pierce/Perbio, Bonn) zugesetzt.

Um den Proteinextrakt in eine lösliche und nicht-lösliche Fraktion zu trennen, wurde dieser nach zehnminütiger Inkubation auf Eis über eine Lage vorher angefeuchtetes „Miracloth“ (Merck Biosciences, Darmstadt) filtriert. Anschließend folgte eine zehnminütige Zentrifugation bei 12.000 x g. Im Überstand befinden sich die löslichen Proteine; das Sediment enthält membranassoziierte Proteine, welche in Carbonat-Probenpuffer resuspendiert wurden. Das zu wählende Volumen hängt von der Größe des Sediments ab. Arbeitet man in dem oben genannten Maßstab (ca. 1 ml), sollte es sich im Bereich zwischen 30 und 300 µl bewegen.

Carbonat-Probenpuffer

100 mM Na₂CO₃
10% Saccharose
50 mM DTT

2.2.2.1.2 Mengenabschätzung extrahierter Proteine

2.2.2.1.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmung anhand der Chlorophyllkonzentration nach Arnon (1949)

Die Konzentration von aus Pflanzen isolierten Proteinen im jeweiligen Extrakt (siehe 2.2.2.1.1) wurden mit Hilfe der Chlorophyllkonzentration bestimmt. Die Chlorophyllkonzentration wurde abgeändert nach Arnon (1949) bestimmt. Dafür wurde ein Aliquot des Proteinextraktes 1:200 in 80%igem Aceton verdünnt, geschüttelt und für drei Minuten bei 14.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 654 nm, der Wellenlänge, bei der Chlorophyll A und B den gleichen Extinktionskoeffizienten aufweisen, gegen Extraktionspuffer 1:200 in 80%igem Aceton gemessen. Die Chlorophyllkonzentration errechnet sich bei einer vorliegenden 1:200 Verdünnung nach der Formel: $C_{\text{Chlorophyll}} [\text{mg/ml}] = A_{654} \times 5,8$. Für die Ermittlung der ungefähren Proteinkonzentration in [mg/ml] wird dieser Wert mit sechs multipliziert. Konzentrationen von Proteinextrakten chlorophylldefizienter oder albinotischer Pflanzen wurden lediglich relativ zu anderen in Analysen einbezogenen Proben ermittelt (siehe 2.2.2.1.2.2).

2.2.2.1.2.2 Relative Proteinkonzentrationsbestimmung

Um die eingesetzten Proteinmengen für die Analysen relativ zueinander anzupassen, wurden Verdünnungsreihen der jeweiligen Proben in einem Volumen von 5 µl auf „Whatman 3MM“-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel) getropft, 10 Min. bei 65-80°C gebacken, ca. 30 Sek. in Coomassiefärbelösung gefärbt (siehe 2.2.2.2.2) und anschließend unter fließendem Leitungswasser entfärbt. Nach abschließendem Trocknen konnten die für eine „SDS-PAGE“ einzusetzenden Mengen (siehe 2.2.2.2.1) abgeschätzt werden. Überprüft wurde die relative Mengenanpassung mittels „SDS-PAGE“ (siehe 2.2.2.2.1) mit nachfolgender Coomassiefärbung (siehe 2.2.2.2.2) überprüft wurde.

2.2.2.2 Elektrophorese-, Transfer- und Nachweistechiken von Proteinen

2.2.2.2.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinproben wurden in Probenpuffer aufgenommen und vor dem Auftragen denaturiert. Für Gesamtprotein oder die Membranfraktion geschah dies bei 70°C für eine Minute, für lösliche Proteine bei 95°C für fünf Minuten. Anschließend wurden die Proben für zehn Minuten bei 15.000 x g zentrifugiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte nach Laemmli 1970. In diesem Fall wurden 10-18%ige Polyacrylamid Trenngele mit einem jeweils 8%igen Polyacrylamid Sammelgel verwendet (Rotiphorese® Gel 30: 30% Polyacrylamid, 0,8% Bisacrylamid; Roth, Karlsruhe). Nach der Elektrophorese wurde das Gel entweder mit Coomassiefärbelösung gefärbt (siehe 2.2.2.2.2), oder die ihrer Größe entsprechend aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert (siehe 2.2.2.2.4).

Probenpuffer

240 mM Tris-HCl
20 mM EDTA
4% SDS
20% (v/v) Glycerin
pH 6.8 mit HCl
Bromphenolblau
14% (v/v) β-Mercaptoethanol

4x Trenngelpuffer

1.5 M Tris-HCl
8 mM EDTA
0.4% SDS
pH 8.8 mit HCl

4x Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-HCl
8 mM EDTA
0,4% SDS
pH 6,8 mit HCl

SDS-PAGE-Laufpuffer

25 mM Tris
0,2 M Glycin
0,1% SDS

2.2.2.2.2 Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Um Proteine nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung unspezifisch im Gel anzu-färben, wurde dieses entweder mindestens für eine Stunde bei 50°C oder über Nacht bei Raumtemperatur in Coomassiefärbelösung geschüttelt. Die Entfärbung erfolgte in immer wieder zu erneuernder 12%iger Essigsäure über mehrere Stunden oder alter-nativ durch mehrfaches Aufkochen des Gels im Essigsäurebad in der Mikrowelle.

Coomassiefärbelösung

0,1% Coomassie Brilliant Blau R250
10% Essigsäure
30% Methanol

2.2.2.2.3 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen nach Blum, H. *et al.* (1987)

Eine sensitivere Methode des Anfärbens von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel bietet die Silberfärbung (Blum, H. *et al.* 1987). Dazu wurde das Polyacrylamidgel für eine Stunde fixiert. Es folgten drei halbstündige Waschschrte in 50%igem Ethanol. Zur Vorbehandlung des Gels vor der Färbung wurde dieses exakt 1,5 Minuten in 0,02%iger Natriumthiosulfatlösung (frisch hergestellt aus 10% Stammlösung) geschwenkt und im Anschluss dreimal je 30 Sek. mit Wasser gewaschen. Die folgende 30minütige Inkubation in der Färbelösung muss im Dunkeln ablaufen. Vor der Entwicklung wurde zweimal gründlich mit Wasser gewaschen. Die Entwicklung wurde bei gewünschter Stärke der Färbung durch Austausch der Entwicklerlösung gegen Stopplösung abgebrochen.

Fixierlösung

50% Ethanol
12% Essigsäure
0,05% Formaldehyd

Färbelösung (frisch)

0,2% Silbernitrat
0,075% Formaldehyd

Entwicklerlösung (frisch)

6% Natriumcarbonat
0,05% Formaldehyd
0,0004% Natriumthiosulfat

Stopplösung

50% Ethanol
12% Essigsäure

2.2.2.2.4 Proteintransfer auf Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membranen („Western-Blot“)

Für die Immunodetektion (siehe 2.2.2.2.5) wurden die mittels „SDS-PAGE“ (siehe 2.2.2.2.1) aufgetrennten Proteine diskontinuierlich, halbtrocken auf eine Membran transferiert (modifiziert nach Kyhse-Andersen 1984). Vorbehandelt wurde die PVDF-Membran durch Schwenken in Methanol, gefolgt von zweimaligem Waschen mit Wasser für insgesamt fünf Minuten und anschließendem Äquilibrieren der Membran in Anodenpuffer II. Das Gel wurde zur Entfernung evtl. beim Transfer störender Salze nach der Elektrophorese in Kathodenpuffer geschwenkt. Der Transfer erfolgte in einer Halbtrocken-Blotapparatur „TE 77 PWR Semi-Dry Transfer Unit“ (GE Healthcare, Freiburg). Der Aufbau von der Anodenseite (unten) begann mit drei Schichten in Anodenpuffer I getränktem „Whatman 3MM“-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel), gefolgt von zwei Schichten, getränkt in Anodenpuffer II. Darauf wurde die vorbehandelte Membran platziert und das vorbehandelte Gel luftblasenfrei darüber gelegt. Zur Kathodenseite (oben) wurde der Aufbau mit drei Schichten mit Kathodenpuffer getränktem „Whatman 3MM“-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel) abgeschlossen und Spannung angelegt. Der Transfer erfolgte bei konstanter Stromstärke von 0,8 mA pro Quadratzentimeter Gelfläche für 20 Minuten bis zu einer Stunde.

Die Membran wurde direkt für eine folgende Immunodetektion verwendet, oder nach erfolgtem Transfer zwischen zwei „Whatman 3MM“-Papieren (Schleicher & Schuell, Dassel) zur Aufbewahrung getrocknet. Zur weiteren Verwendung musste diese dann nochmals in Methanol aktiviert und zweifach mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen werden.

Anodenpuffer I

0,3 M Tris**Anodenpuffer II**

25 mM Tris/HCl, pH 10,4**Kathodenpuffer**

0,04 M 6-Aminocapronsäure
0,01% SDS

2.2.2.2.5 Immunodetektion von Proteinen auf PVDF-Membranen

Zur Immunodetektion von Proteinen wurde zunächst die Membran (siehe 2.2.2.2.4) bei 4°C über Nacht oder bei Raumtemperatur solange bis sie transparent erschien in Blockierlösung inkubiert. Nach dreimal zehnmütigem Waschen mit TBST wurde die Membran in Antikörperlösung (Antikörper 1:500 bis 1:20.000 in TBST verdünnt) für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Weiteren drei Waschschritten mit TBST folgte eine einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:10.000 bis 1:25.000 verdünnt). Die Visualisierung erfolgte je nach gewähltem Sekundärantikörper nach weiteren drei zehnmütigen Waschschritten mit TBST.

TBST

20 mM Tris/HCl, pH 7,6
137 mM NaCl
0,1-1% Tween 20 (frisch zugesetzt)**Blockierlösung M**

5% Trockenmilch in TBST**Blockierlösung BSA**

1% BSA in TBST

2.2.2.2.5.1 Luminol (Chemilumineszenz)

Für den Chemilumineszenznachweis wurde ein Meerrettichperoxidase-gekoppelter Sekundärantikörper (Sigma-Aldrich, München) verwendet. Das Prinzip des Nachweises ist die Oxidation des Luminols durch Wasserstoffperoxid, katalysiert durch die Meerrettichperoxidase. Die Membran wurde mit einer Lösung aus gleichen Teilen Luminollösung und Wasserstoffperoxidlösung benetzt, nach einer Minute die überschüssige Flüssigkeit entfernt und die Membran in Folie verpackt. Die Detektion der

Signale erfolgte mit Röntgenfilmen (Fuji, Düsseldorf). Die Expositionszeit richtete sich dabei nach der Stärke der Signale und reichte von einer Sekunde bis zu 15 Minuten.

Luminollösung

100 mM Tris/HCl, pH 8,5
2,5 mM Luminol
0,4 mM Cumarsäure

Wasserstoffperoxidlösung

100 mM Tris/HCl; pH8,5
0,02% H₂O₂

2.2.2.2.5.2 Alkalische Phosphatase (kolorimetrisch)

Für den kolorimetrischen Nachweis wurde ein Sekundärantikörper, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, verwendet (vgl. 2.2.1.6.7.2). Die Visualisierung erfolgte direkt auf der Membran mit NBT/BCIP (Sigma-Aldrich, München), nachdem die Membran für einige Minuten in Detektionspuffer äquilibriert wurde. Die Reaktion wurde durch Waschen der Membran mit Wasser gestoppt.

Detektionspuffer

0,1 M Tris 9,0
0,1 M NaCl

2.2.3 Transformationstechniken, Mutagenese und somatische Zellfusionierung

2.2.3.1 Transformation von *E.coli* durch RbCl₂/CaCl₂ und Hitzeschock

Die Herstellung chemokompetenter *E.coli* Zellen (DH5α) erfolgte mittels RbCl₂ in Kombination mit CaCl₂. Hierzu wurde eine *E.coli* Übernachtskultur 1:50 in 100ml LB-Medium plus je 10 mM MgCl₂ und MgSO₄ verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 angezogen. Nach einer halbstündigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 3.000 x g für ca. acht Minuten pelletiert und nach vollständiger Entfernung des Überstandes und Resuspendierung des Pellets in 33 ml RF1 Puffer erneut für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Die darauf folgende Zentrifugation wurde mit den gleichen Parametern wie die erste durchgeführt, das Pellet im Anschluss an die vollständige Entfernung des Überstandes jedoch in 5 ml RF2 Puffer resuspendiert. Nach weiteren 30 Minuten auf Eis konnten die Zellen in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt werden.

RF1 Puffer (sterilfiltriert)

RbCl₂ 100 mM
MnCl₂ 50 mM
Kaliumacetat 30 mM* (KAc)
CaCl₂ 10 mM
Glycerin 15% (w/v)

* aus 1 M KAc Stammlösung: pH 5,8, eingestellt mit
0,2 M Essigsäure

RF2 Puffer (sterilfiltriert)

MOPS 10 mM
RbCl₂ 10 mM
CaCl₂ 75 mM
Glycerin 15% (w/v)

* aus 0,5 M MOPS Stammlösung: pH 5,8, eingestellt
mit NaOH

LB-Medium (1 l):

Pepton aus Casein, tryptisch verdaut 10 g
Hefeextrakt 5 g
NaCl 10 g (170 mM)
ad 1 l H₂O_{bidest}

pH 7,0 mit 5 N NaOH eingestellt; autoklaviert für 16
Minuten bei 116°C

Zur Transformation mit Plasmiden wurden diese (ca. 1 µl einer Plasmidpräparation bzw. ein vollständiger Ligationsansatz, siehe 2.2.1.1 bzw. 2.2.1.7.7) zusammen mit 100 µl frisch aufgetauten RbCl₂-kompetenten Zellen für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Einem einminütigen Hitzeschock bei 42°C folgten dreißig Minuten bei 37°C nach Zugabe von 300 µl LB-Medium zur Ausprägung der mit dem entsprechenden Plasmid erworbenen Antibiotikaresistenz. Von diesem Ansatz wurden jeweils 50 µl und der Rest auf LB-Selektivmedium (100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert.

Die Transformation wurde gegebenenfalls mittels PCR (siehe 2.2.1.7.1) überprüft. Dafür wurden Kolonien gepickt und in 10 µl sterilem H₂O suspendiert. Dies und der initiale fünfminütige Denaturierungsschritt der anschließenden PCR (siehe 2.2.1.7.1) waren ausreichend, um Segmente des enthaltenen Plasmids amplifizieren zu können. Positiv getestete Kolonien konnten direkt aus der Suspension in selektives LB-Medium angeimpft werden.

2.2.3.2 Plastidentransformation an isolierten Blättern nach Svab *et al.* (1990)

Die Plastidentransformation für höhere Pflanzen wurde für Tabak von Svab *et al.* (1990) beschrieben. Das hier angewendete Protokoll beruht auf einem modifizierten Verfahren (Svab und Maliga 1993), wobei mit DNA beladene Goldpartikel (Microcarrier, siehe 2.2.3.2.1) mit hoher Geschwindigkeit in Blattgewebe geschossen werden, was zum Begriff der „biolistischen“ (biologisch und ballistisch) Transformation geführt hat. Das plastidäre Rekombinationssystem ermöglicht eine zielgerichtete Integration von Transgenen bzw. den Austausch bestimmter Bereiche des Plastidengenoms, wodurch sich die Möglichkeit einzelner Basenaustausche eröffnet. Der auszutauschende Bereich muss hierbei von zwei, dem Plastidengenom homologen Bereichen flankiert sein. Des Weiteren wird der auszutauschende Bereich mit einem Resistenzmarker gekoppelt, welcher Selektion auf das Rekombinationsereignis ermöglicht (siehe 2.2.3.2.3).

2.2.3.2.1 Beladung der Goldpartikel mit DNA

Im Gegensatz zum ursprünglichen Protokoll wurden als „Microcarrier“ Goldpartikel mit einer Partikelgröße von 0,6 µm (Biorad, München) verwendet, von denen eine Suspension mit einer Konzentration von 60 mg/ml in Ethanol hergestellt wurde. Pro Ansatz wurden 35 µl dieser Goldsuspension zur Beladung mit dem jeweiligen Transformationsvektor verwendet. Als Transformationsvektor diente zirkuläre Plasmid-DNA, die mit einem „QIAGEN Plasmid Midi Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt worden war. Nach Zentrifugation der Goldpartikel für zehn Sekunden bei 14.000 x g bei Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen und die Goldpartikel in 1 ml sterilem H₂O_{bidest} resuspendiert. Dem folgte ein weiterer einminütiger Zentrifugationsschritt mit ansonsten gleichen Parametern; der Überstand wurde wieder verworfen. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis bzw. im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Zunächst wurden die Goldpartikel in 230 µl sterilem H₂O_{bidest} resuspendiert. 25 µl der Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 1 µg/µl wurde zur Goldsuspension gegeben. Danach folgte die Zugabe von 250 µl 2,5 M CaCl₂-Lösung und 50 µl frisch präparierter 0,1 M Spermidinlösung (Sigma-Aldrich, München). Dieser Ansatz wurde auf einem „Vortex Genie2“ (Scientific Industries, Inc.; Bohemia, NY, USA) auf Stufe 5-6 für 20 Minuten geschüttelt. Die nun mit dem Transformationsvektor beladenen

Goldpartikel wurden für eine Minute bei 14.000 x g abzentrifugiert und anschließend in 600 µl Ethanol resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt und die beladenen Goldpartikel in 72 µl Ethanol resuspendiert.

2.2.3.2.2 „Biolistischer“ Transfer der Goldpartikel in das Blattgewebe

Das verwendete Blattmaterial stammte von *in vitro* gewachsenen ca. 4 Wochen alten Tabakpflanzen (siehe 2.2.4). Die abgenommenen Blätter wurden einen Tag vor dem Beschuss mit der adaxialen Seite auf RMOP-Medium gelegt. Beschossen wurde die abaxiale Blattseite.

Der Transfer erfolgte mit einem „PDS-1000/He BIOLISTIC® PARTICLE DELIVERY SYSTEM“ (Biorad, München) unter sterilen Bedingungen. Dazu wurden 5,4 µl der Suspension beladener Goldpartikel in Ethanol auf einen sogenannten „Macrocarrier“ transferiert, der vorher in einem „Macrocarrier“-Träger fixiert worden war. Nachdem der Ethanol verdunstet war, wurde dieser Träger mit dem „Macrocarrier“ im „PDS-1000/He BIOLISTIC® PARTICLE DELIVERY SYSTEM“ fixiert und unter Vakuum (25 inches Quecksilbersäule) die Goldpartikel mit einem Druck von 1100 psi beschleunigt. Der Druck wurde dabei durch ein bei definiertem Druck reißendes Kunststoffplättchen („Rupture Disc“) eingestellt. Als Gas diente Helium, dessen Druck auf ca. 1300 psi eingestellt wurde. Das zu beschießende Blatt wurde auf dem Halter im dritten Einschub von unten platziert, der „Macrocarrier“ im fünften Einschub von unten. Die Feinjustierung der „Macrocarrier“-Halterung erfolgte so, dass oberhalb des Einschubs elf und unterhalb vier Gewinderinge des Messinggewindes sichtbar waren.

2.2.3.2.3 Selektion transplastomischer Pflanzenlinien

Die beschossenen Blätter wurden nach zwei Tagen in ca. 0,5 cm² große Stücke geschnitten und mit der abaxialen Seite auf RMOP-Selektivmedium transferiert, welches Spektinomycin (Spektinomycin-dihydrochlorid-pentahydrat, Fluka, Sigma-Aldrich, München) in einer Konzentration von 600 µg/ml enthielt. Spektinomycin, das in Pflanzenzellen durch die Interaktion mit der 30S Ribosomenuntereinheit die organelläre Translation hemmt, dient der Selektion auf die Integration des mit dem entsprechenden Transformationskonstrukt eingebrachten Resistenzmarkers. Dabei

handelt es sich um ein chimäres bakterielles *aadA* Gen, welches unter Kontrolle des plastidären 16S rDNA-Promotors aus Tabak steht und eine synthetische Shine-Dalgarno Sequenz sowie den 3' Bereich des *rbcL* Gens aus *Chlamydomonas reinhardtii* besitzt (Koop *et al.* 1996). *aadA* kodiert für eine Aminoglykosid-3"-adenylyltransferase, welche, in Chloroplasten exprimiert, Aminoglykosidantibiotika wie Spektinomycin (oder Streptomycin) inaktiviert (Goldschmidt-Clermont 1991).

Nach zwei Wochen in der Gewebekulturkammer (siehe 2.2.4) wurden diese nun meist aufgequollenen Stücke nochmals klein geschnitten und auf neues RMOP-Selektionsmedium überführt. Weitere drei bis sechs Wochen später bilden sich Kalli und in der Folge Sprosse aus. Nicht-resistente Regenerate bleichen aufgrund der Wirkung von Spektinomycin aus, während resistente Regenerate in der Regel photosynthetisch aktiv sind.

2.2.3.2.4 Test auf Homoplastomie von transplastomischen Pflanzenlinien

Es wird angenommen, dass das primäre Transformationsereignis jeweils nur ein, maximal jedoch einige wenige Kopien der bis zu 10.000 in einer Mesophyllzelle vorhandenen Plastidenchromosomen betrifft. Dies führt zu einem Zustand der als „heteroplastomisch“ bezeichnet wird. Es befinden sich also innerhalb eines Chloroplasten verschiedenartige Plastidenchromosomen („intraplastidäre Heteroplastomie“). Die Selektion auf das Transformationsereignis (siehe 2.2.3.2.3) führt zum sukzessivem Verlust der Wildtyp Kopien. Nach zwei bis vier Regenerationsrunden unter selektiven Bedingungen wird meist ein homoplastomischer Zustand erreicht, in dem nur noch die transformierte Form der Plastidenchromosomen nachzuweisen ist.

Die Überprüfung der in dieser Arbeit hergestellten transplastomischen Pflanzen, erfolgte mittels RFLP-Analyse. Die unterschiedlichen Restriktionsfragmente plastidärer DNA für Mutante und Wildtyp wurden mittels „Southern“-Hybridisierung (siehe 2.2.1.6.2) nachgewiesen. Neben der RFLP-Analyse fand noch die CAPS Technik („Cleaved Amplified Polymorphic Sequences“) Anwendung. Durch die eingefügte Mutation kann eine Restriktionsschnittstelle entstehen oder verloren gehen. Mit spezifischen Primern wurde die entsprechende Region aus Gesamtzell-DNA

mittels PCR (siehe 2.2.1.7.1) amplifiziert. Die Restriktion führt zu einem unterschiedlichen Bandenmuster für mutanten- und wildtypspezifische Amplifikate. Der Zustand der Homoplastomie wurde für beide Verfahren angenommen, wenn kein wildtypspezifisches Muster mehr nachzuweisen war.

2.2.3.3 Chemische Mutagenese somatischer Pflanzenzellen

Die chemische Mutagenese somatischer Zellen an isolierten Blattstücken wurde von Dr. Sergei Kushnir (Universität Gent, Belgien), basierend auf der Beschreibung von McCabe *et al.* (1989), durchgeführt. Dazu wurden ca. 400 Blattstücke für eine Stunde in flüssigem MS-Medium (siehe 2.2.4.1) in 5 mM NMU-Lösung (N-Nitroso-N-methylharnstoff) inkubiert. Nach sorgfältigem Waschen der Blattstücke mit sterilem H₂O wurden diese auf modifiziertes RMOP-Festmedium (siehe 2.2.4.1) mit 0,5 mg/l BAP und 0,1 mg/l NAA transferiert, um Sprosswachstum zu induzieren.

2.2.3.4 Herstellung cytoplasmatischer Hybriden (Cybriden)

Genotypen und Referenzen des für diese Arbeit verwendeten Pflanzenmaterials sind in Tabelle 3-1 aufgeführt. Alle Cybriden (siehe Tabellen 3-1, 3-2 und 3-5) wurden im Labor von Dr. Sergei Kushnir (Universität Gent, Belgien) durch Polyethylenglykol-induzierte Fusion von Mesophyll-Protoplasten und anschließende Selektion auf verschiedene Resistenzmarker und/oder phänotypische Ausprägungen hergestellt. Die Protoplastenisolierung, Fusion und Kultivierung erfolgte wie in Kushnir *et al.* 1991 beschrieben. Als nukleäre Resistenzmarker wurden die Kanamycinresistenzkassette *nptII* und das gegen Glufosinat-Ammonium (BASTA) Resistenz verleihende Gen *bar* verwendet. Plastidäre Resistenzmarker waren eine mutierte Version des plastidären 16S rRNA-Gens (*rrn16^S*) sowie die *aadA* Resistenzkassette (siehe 2.2.3.2.3, Koop *et al.* 1996) welche jeweils Resistenz gegen Spektinomycin und Streptomycin erzeugen. Als weiterer phänotypischer Selektionsmarker diente eine nicht identifizierte Mutation (X, vgl. Tab. 3-1) in der Tabak Linie A15 (Svab und Maliga 1986), die maternal vererbt einen albinotischen Phänotyp erzeugt, also höchstwahrscheinlich plastidären Ursprungs ist.

2.2.3.5 Herstellung der Glufosinat-Ammonium-resistenten *N. tabacum* Linie BarD

Die Glufosinat-Ammonium-resistente, zur Herstellung von partiellen Cybriden verwendete, *N. tabacum* Linie BarD (siehe Tab. 3-1) wurde von Dr. Sergei Kushnir (Universiteit Gent, Belgien) durch Transformation der *N. tabacum* Linie SR1 (Maliga *et al.* 1975) mit *Agrobacterium tumefaciens* C1Rifr (pGV2260; pGSFR280) hergestellt.

2.2.4 Pflanzengewebekultur

Neben der Haltung von Pflanzen im Gewächshaus wurden diese auch zum Teil unter sterilen Bedingungen in Gewebekultur bei konstanten 24°C und Licht-/Dunkelzyklen von 16/8 Stunden gehalten. Als Lichtquelle wurden Leuchtstofflampen der Firma Philips (Hamburg) mit der Spezifikation „TLD 58W/25“ eingesetzt.

2.2.4.1 Gewebekulturmedien

Für die Pflanzengewebekultur wurde ausschließlich MS-Medium mit Mikrosalzen und Vitaminen der Firma Duchefa Biochemie (Haarlem, NL), basierend auf der Vorschrift von Murashige und Skoog (1962) verwendet. Das Regenerationsmedium RMOP entspricht in Salz- und Vitaminzusammensetzung dem MS-Medium und enthält zusätzlich BAP (1 mg/l) und NAA (0,1 mg/l). Sowohl dem MS-, als auch dem RMOP-Medium wurde Saccharose (30 g/l, Sigma-Aldrich, München) zugesetzt. MS-Medium wurde für alle Cybriden in flüssiger Form verwendet, für alle anderen Pflanzen wurde es durch Zusatz von 0,6-0,8% Agar (Sigma-Aldrich, München) verfestigt.

2.2.4.2 Samensterilisierung

Samen der Gattungen *Nicotiana* und *Atropa* wurden durch 15minütiges Schütteln in 15%iger „Dan Chlorix“-Lösung (Colgate Palmolive, Hamburg) mit etwas Tween20 (Roth, Karlsruhe) und anschließend einminütigen Schütteln in 70%igem Ethanol sterilisiert. Vor dem Transfer der Samen auf MS-Medium (siehe 2.2.4.1) wurden diese dreimal für sechs Minuten in sterilem H₂O_{bidest} gewaschen.

Arabidopsis thaliana Samen wurden für sieben Minuten in Sterilisierungslösung (32% „Dan Chlorix“; 0,8% N-Lauryl-Sarcosinat aus 20%iger Stammlösung) geschüttelt und danach abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Samen in einem Milliliter sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen (geschüttelt), abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde fünfmal wiederholt und die Samen im Anschluss auf MS-Medium überführt.

2.2.5 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Abbildungen wurden von Herrn Prof. Dr. G. Wanner (LMU München) mit einem „EM 912 Elektronenmikroskop“ (LEO, Oberkochen) angefertigt.

Kleine Blattstücke wurden mit 2,5% Glutardialdehyd in 75 mM Natriumkakodylat, 2 mM MgCl_2 , pH 7,0 für zwei Stunden bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde das Material mehrmals im gleichen Puffer gewaschen und für eine Stunde in 1% Osmiumtetroxid bei Raumtemperatur nachfixiert. Nach zwei weiteren Waschschriften in destilliertem Wasser wurden die Gewebestückchen für eine Stunde mit 1% Uranylacetat in 20% Aceton gefärbt. Die Dehydrierung erfolgte in einem Acetongradienten. Schließlich wurden die Blattstückchen infiltriert und in einem niedrigviskosen Harz nach Spurr 1969 eingebettet. Nach der Polymerisation des Harzes wurden Ultradünnschnitte (50-70 nm) mit einer Diamantklinge angefertigt und auf collodionummantelte Kupfergitter aufgebracht. Diese Schnitte wurden mit wässrigem Bleicitrat (100 mM, pH 13,0) nachkontrastiert.

3. Ergebnisse

3.1 Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität in [*Atropa belladonna* (*Nicotiana tabacum*)]-Cybriden

Um den albinotischen Phänotyp der [Ab(Nt)]-Cybride (Abb. 3-1 A, Kushnir *et al.* 1991), aufzuklären, ist das Plastidengenom der Tollkirsche vollständig sequenziert und mit dem bereits sequenzierten Tabakplastidengenom (Acc. Nr. Z00044) verglichen worden (Schmitz-Linneweber *et al.* 2002). Über diesen Vergleich sollten potentielle plastidäre Determinanten für die Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität identifiziert werden. Der Sequenzvergleich zeigte eine über 96%ige Übereinstimmung der beiden Plastome, wobei die meisten Unterschiede nicht-kodierende Regionen des Plastidengenoms betreffen (Schmitz-Linneweber *et al.* 2002). Im Folgenden sollen kurz die für diese Arbeit relevanten Unterschiede innerhalb kodierender Bereiche zusammengefasst werden.

Unterschiede in homologen Polypeptiden beschränken sich größtenteils auf Aminosäuresubstitutionen an nicht konservierten Positionen. Nur elf identifizierte Aminosäuresubstitutionen befinden sich an hoch konservierten Positionen, wovon fünf (*atpA*-264, *ndhD*-200, *ndhD*-225, *psbE*-72 und *rps14*-50; die Zahl bezeichnet die jeweilige Aminosäureposition des entsprechenden Gens in Tabak) auf mRNA-Ebene in *N. tabacum* durch RNA Edierung in das entsprechend konservierte Codon überführt werden und somit nicht als Unterschiede gewertet werden können. Das Gleiche trifft auf drei weitere Aminosäuresubstitutionen zu, wobei hier in *A. belladonna* das jeweils in *N. tabacum* bereits auf DNA-Ebene kodierte Codon durch RNA Edierung auf mRNA-Ebene hergestellt wird (*ndhA*-189, *ndhD*-293 und *rpoB*-809; AA in *A. belladonna*). Neben Aminosäuresubstitutionen finden sich auch viele Insertionen bzw. Deletionen. Während es in nicht-kodierenden Bereichen davon über 100 gibt, ist die Anzahl in kodierenden Bereichen auf zehn beschränkt, die sich ausnahmslos innerhalb nicht konservierter Domänen befinden. Ein für die Inkompatibilität des *A. belladonna* Kerngenoms mit dem *N. tabacum* Plastidengenom in Frage kommender Polymorphismus fand sich in *rpoC2* im Bereich einer potentiellen Bindedomäne für nukleär kodierte Sigmafaktoren (Schmitz-Linneweber *et al.* 2002).

Da nicht abschließend geklärt werden konnte, auf welche Unterschiede zwischen den Plastomen die phänotypische Ausprägung der [Ab(Nt)]-Cybride zurückzuführen ist, sollte ausgehend von den vorhandenen Daten die letztendlich verantwortlichen

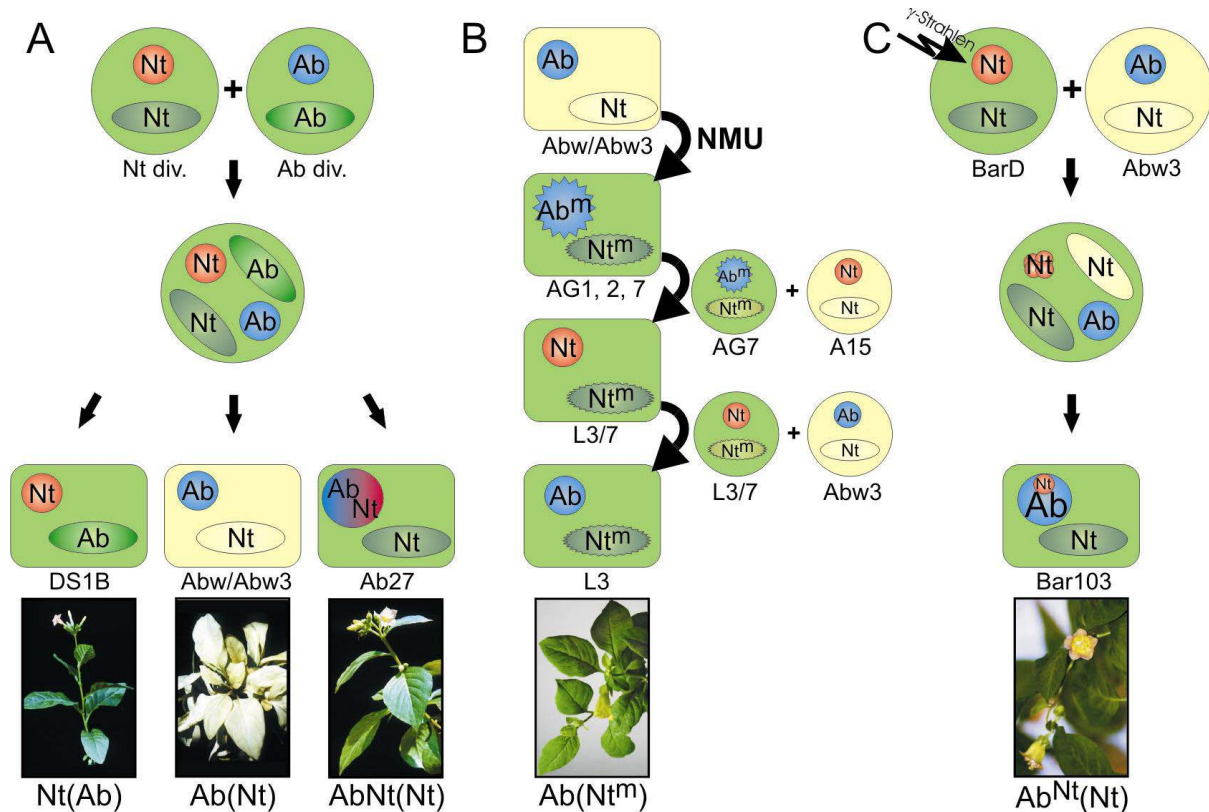


Abbildung 3-1: Herstellung somatischer Hybriden und Suppressormutanten

A) Schema eines somatischen Zellhybridisierungsexperiments mit *N. tabacum* und *A. belladonna* Protoplasten diverser Linien (vgl. Tab. 3-1). Unterschiedliche Selektionsstrategien führen zu reziproken Cybriden, [Ab(Nt)] oder [Nt(Ab)], oder symmetrischen nukleären Hybriden, [AbNt(Nt)]. **B)** Herstellung der [Ab(Nt^m)] Suppressorlinie L3. NMU (N-Nitroso-N-methylharnstoff) induzierte Mutagenese und somatischer Transfer des mutagenisierten *N. tabacum* Plastoms in den nukleären Hintergrund von *A. belladonna*. **C)** Herstellung der partiellen Hybride Bar103 [Ab^{Nt}(Nt)]. Die nukleären Chromosomen einer der parentalen Linien werden durch γ -Strahlung fragmentiert. Die Selektion auf den nukleären Resistenzmarker verhindert den vollständigen Verlust der Chromosomenfragmente der bestrahlten Linie. **Symbole und Abkürzungen:** große Kreise: Protoplasten; abgerundete Rechtecke: Pflanzenzellen; kleine Kreise: Nuklei; kleine Ovale: Plastiden; grün: photoautotrophes Wachstum; gelb: albinotischer Phänotyp; gezackte Umrandung: mutagenisiertes Genom; Nt: *Nicotiana tabacum*; Ab: *Atropa belladonna*; hochgestelltes „m“: mutagenisiertes Genom; hochgestelltes „Nt“: partielles nukleäres Nt Kerngenom; in Klammern: Plastom; Bezeichnung und Genotypen der jeweiligen Linien wie in Tab. 3-1.

Faktoren identifiziert werden. Die Grundlage der Untersuchungen bildeten hierfür klassisch und revers genetische Ansätze, kombiniert mit der Möglichkeit des somatischen interspezifischen Transfers der verschiedenen Genome.

3.1.1 Analyse der Insertion/Deletion in *rpoC2*

Im Leserahmen von *rpoC2* befindet sich eine Insertion/Deletion von neun zusammenhängenden Nukleotiden (Schmitz-Linneweber *et al.* 2002). Die betroffene Region zählt zu einem der wenigen schnell evolvierenden Bereiche des Plastidengenoms (Cummings *et al.* 1994). Disruptionsmutanten von Genen, die Untereinheiten der

plastidär kodierten RNA Polymerase (PEP) kodieren, zeigen wie die [Ab(Nt)]-Cybride einen Chlorophyll-defizienten Phänotyp (Allison *et al.* 1996; De Santis-Maclossek *et al.* 1999). Weiter ist die in Prokaryoten dem *rpoC2*-Genprodukt homologe Unter-einheit der RNA Polymerase für die Interaktion mit Sigmafaktoren verantwortlich (Arthur und Burgess 1998; Arthur *et al.* 2000). Sigmafaktoren sind in pflanzlichen Zellen kernkodiert. Ein für Sigmafaktoren kodierendes nukleäres Gen im Kerngenom von *A. thaliana* ist z.B. *SIG2*. *Arabidopsis* T-DNA-Insertionsmutanten in *SIG2*, zeigen einen hellgrünen und im Wachstum eingeschränkten Phänotyp (Kanamaru *et al.* 2001). Eine generell gestörte Sigmafaktorbindung aufgrund der Insertion/Deletion in *rpoC2* könnte also potentiell eine Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität darstellen, die den albinotischen Phänotyp der [Ab(Nt)]-Cybride erklären könnte.

Eine direkte Plastidentransformation in der [Ab(Nt)]-Cybride ist nicht möglich (Schmitz-Linneweber 2002). Deshalb sollte zur Klärung, ob dieser Unterschied zwischen den beiden Plastidengenomen tatsächlich ausschlaggebend für die Ausprägung des albinotischen Phänotyps ist, ein verändertes *N. tabacum* Plastom, das die *A. belladonna* spezifische Deletion in *rpoC2* trägt, in den *A. belladonna* Kern-hintergrund gebracht werden. Wären solche Cybriden photoautotroph, könnte davon ausgegangen werden, dass dieser Unterschied tatsächlich die Hauptursache für die gestörte Interaktion zwischen Kern und Plastide ist.

3.1.1.1 Herstellung transplastomischer *Nicotiana tabacum* Linien mit *Atropa belladonna* spezifischer Deletion in *rpoC2*

Zunächst wurden transplastomische *N. tabacum* Linien hergestellt, die als Plastidendonor für die Cybridisierungsexperimente dienen sollten. Dazu wurden Konstrukte hergestellt, in denen das entsprechende *A. belladonna* *rpoC2*-Fragment mit der *aadA*-Kassette (Koop *et al.* 1996) gekoppelt ist, die als Resistenzmarker für die Plastidentransformation dient. Hierzu wurde ein *NcoI*-*Bam*HI Fragment, welches den Ausschnitt des *A. belladonna* Plastoms (Acc. Nr. AJ316582) von Position 15.055 bis 18.710 repräsentiert, in pBluescript SKII- (Stratagene, Heidelberg) kloniert. Anschließend wurde die *aadA*-Kassette in die einzige *EcoRV* Restriktionsschnittstelle des Fragments, die sich in einem Abstand von 22 Bp zum Stop-Codon von *rpoC2* befindet, in der gleichen Orientierung wie *rpoC2* inseriert (Abb. 3-2 A). Der so hergestellte

Transformationsvektor pC2A wurde für die anschließende biolistische Plastidentransformation verwendet.

Die zwei isolierten transplastomischen Tabaklinien (C2A-2 und C2A-9, Abb. 3-2 A), wurden mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung auf die Mutation getestet (nicht gezeigt). Der Genotyp ist beschrieben mit [Nt(Nt:AbC2)]. Dabei bezeichnet [Nt] das Kerngenom, hier für *Nicotiana tabacum*; [(Nt:AbC2)] beschreibt das modifizierte Plastom aus *N. tabacum*, welches die Deletion im *rpoC2*-Gen aus *Atropa belladonna* trägt (Abb. 3-2 A, Tab. 3-1). Homoplastomie der Pflanzen wurde nach einigen Regenerationszyklen mittels Southernanalysen bestätigt (nicht gezeigt).

Tabelle 3-1: Genotypen, Phänotypen und Beschreibung verwendeter und hergestellter Pflanzenlinien

Kerngenom(Plastom)	Bezeichnung	Phänotyp	Selektionsmarker Kerngenom Plastom		Beschreibung/Herstellung	Referenz	
Ab(Ab)	Ab5	grün	<i>nptII</i>	-	Wildtyp Ab, nukleärer Resistenzmarker	(Kushnir <i>et al.</i> 1991)	
Nt(Nt)	SR1	grün	-	<i>rrn16^s</i>	Wildtyp Nt, plastidärer Resistenzmarker	(Maliga <i>et al.</i> 1975)	
Nt(Nt ^{alb})	A15	albino	-	<i>rrn16^s</i> , X	Plastom Rezipient	(Svab und Maliga 1986)	
Nt(Nt)	BarD	grün	<i>bar</i>	<i>rrn16^s</i>	Donor des nukleären Genoms	diese Arbeit	
Nt(Ab)	DS1B	grün	-	-	Cybride, Plastom Ab Wildtyp	(Kushnir <i>et al.</i> 1987)	
Ab(Nt)	Abw	albino	-	-	Cybride, Plastom Nt cv. Gatersleben	(Kushnir <i>et al.</i> 1991)	
Ab(Nt)	Abw3	albino	<i>nptII</i>	<i>rrn16^s</i>	Cybride, Plastom Nt cv. Petit Havanna	(Kushnir <i>et al.</i> 1991)	
Nt(Nt:AbC2)	C2A	grün	-	<i>aadA</i>	plastidäre Mutante: Ab <i>rpoC2</i> (Ab spezifische Deletion in <i>rpoC2</i>)	diese Arbeit siehe Abb. 3-2	
Nt(Nt:NtC2)	C2N	grün	-	<i>aadA</i>	plastidäre Mutante: Nt <i>rpoC2</i> (Kontrolllinie ohne Mutation mit Resistenzmarker)	diese Arbeit siehe Abb. 3-2	
Ab ^m (Nt ^m)	AG1/AG7	grün	<i>nptII</i>	<i>rrn16^s</i>	Ab(Nt) NMU ↓ Ab ^m (Nt ^m)	Abw3 NMU ↓ AG1/7	diese Arbeit siehe Abb. 3-1
Ab ^m (Nt ^m)	AG2	grün	-	-	Ab(Nt) NMU ↓ Ab ^m (Nt ^m)	Abw NMU ↓ AG2	diese Arbeit siehe Abb. 3-1
Nt(Nt ^m)	L3/7	grün	-	<i>rrn16^s</i>	Ab ^m (Nt ^m) + Nt(Nt ^{alb}) ↓ Nt(Nt ^m)	AG7 + A15 ↓ L3/7	diese Arbeit siehe Abb. 3-1
Ab(Nt ^m)	L3	grün	<i>nptII</i>	<i>rrn16^s</i>	Nt(Nt ^m) + Ab(Nt) ↓ Ab(Nt ^m)	L3/7 + Abw3 ↓ L3	diese Arbeit siehe Abb. 3-1
AbNt(Nt)	Ab27	grün	<i>nptII</i>	<i>rrn16^s</i>	Nt(Nt) + Ab(Ab) ↓ AbNt(Nt)	SR1 + Ab5 ↓ Ab27	diese Arbeit siehe Abb. 3-1
Ab ^{Nt} (Nt)	Bar103	grün	<i>nptII</i> , <i>bar</i>	<i>rrn16^s</i>	Nt(Nt) + Ab(Nt) ↓ Ab ^{Nt} (Nt)	BarD + Abw3 ↓ Bar103	diese Arbeit siehe Abb. 3-1
Nt(Nt:CCC)	KA	grün	-	<i>aadA</i>	plastidäre Mutante: <i>atpA</i> P264P (Kontrolllinie ohne Mutation mit Resistenzmarker)		diese Arbeit siehe Abb. 3-4
Nt(Nt:cis)	mA	grün	-	<i>aadA</i>	plastidäre Mutante: <i>atpA</i> P264P, mutierte potentielle Edierungsfaktorbindestelle		diese Arbeit siehe Abb. 3-4
Nt(Nt:TGG)	WAT	albino	-	<i>aadA</i>	plastidäre Mutante: <i>atpA</i> P264W (CCC zu TGG)		diese Arbeit siehe Abb. 3-5
Nt(Nt:CTC)	CAT	grün	-	<i>aadA</i>	plastidäre Mutante: <i>atpA</i> P264L (CCC zu CTC)		diese Arbeit siehe Abb. 3-6

Ab: *Atropa belladonna*; Nt: *Nicotiana tabacum*; Nt^{alb}: nicht identifizierte Mutation im Plastom (X) führt zu einem albinotischen Phänotyp; hochgestelltes „m“: NMU (N-Nitroso-N-methylharnstoff) induzierte Mutationen; AbNt: hybrides Kerngenom mit vollständigen Chromosomensätzen von Ab und Nt; Ab^{Nt}: vollständiges Kerngenom von Ab und partielles Kerngenom von Nt; Resistenzmarker: *nptII*: Kanamycin; *rrn16^s*, *aadA*: Spektinomycin/Streptomycin; *bar*: Glufosinat-Ammonium (BASTA); +: somatische Zellhybridisierung

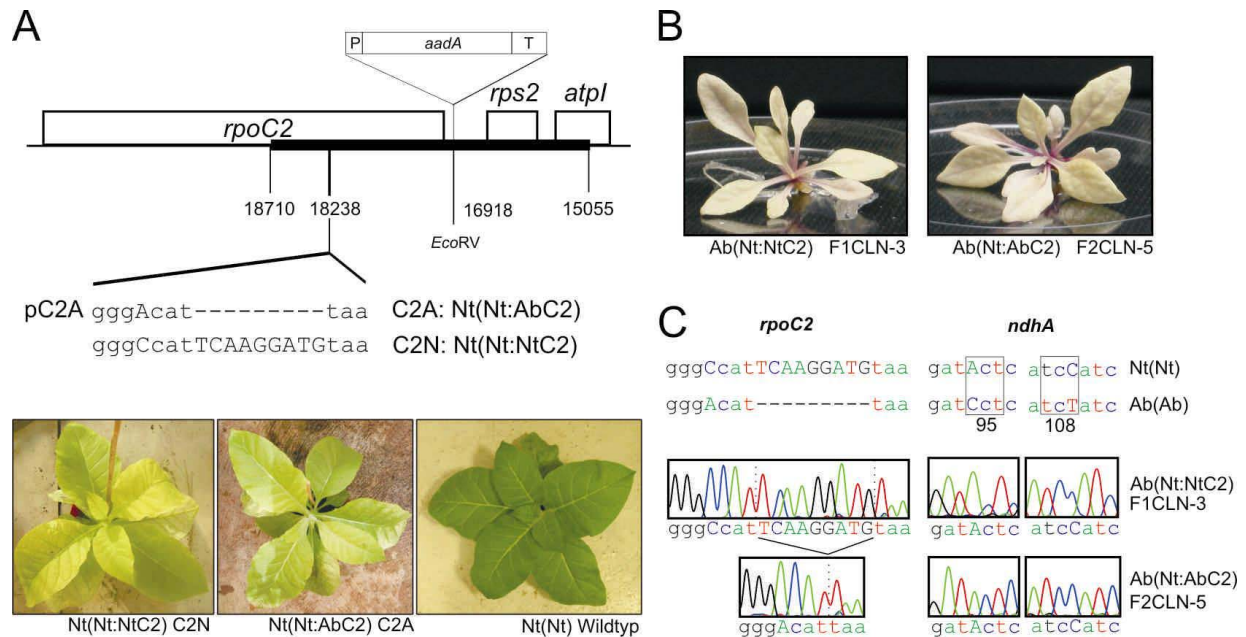


Abbildung 3-2: Transplastomische *N. tabacum* Linien und Cybriden mit *A. belladonna* spezifischer Deletion im *rpoC2*-Gen

A) Genkarte und Konstruktbeschreibung für den Austausch der *N. tabacum* (Nt) spezifischen Insertion gegen die *A. belladonna* (Ab) spezifische Deletion im *N. tabacum* Plastom. Die dicke Linie kennzeichnet das Konstrukt. Alle Gene werden von links nach rechts transkribiert. Die angegebenen Nukleotidpositionen beziehen sich auf das *A. belladonna* Plastom (Acc. Nr. AJ316582). Als Resistenzmarker ist die *aadA*-Kassette 22 Bp stromabwärts des *rpoC2* Stop-Codons inseriert. Die Sequenzausschnitte zeigen die Ab spezifische Deletion im Konstrukt pC2A, die der im modifizierten Plastom [(Nt:AbC2)] der Linie C2A entspricht. Die Kontrolllinie C2N trägt das Nt spezifische Fragment in Kombination mit der *aadA*-Resistenzkassette [(Nt:NtC2)]. Die *N. tabacum* Kontrollpflanze C2N (Genotyp [Kerngenom(Plastom)]: [Nt(Nt:NtC2)]) und die Mutante C2A (Genotyp: [Nt(Nt:AbC2)]) zeigen einen hellgrünen Phänotyp im Vergleich zum *N. tabacum* Wildtyp. **B)** Phänotypische Ausprägung der Cybriden aus somatischen Zellhybridisierungen von *A. belladonna* (Kerngenomdonor) mit der Kontrollpflanze [Nt(Nt:NtC2)] bzw. der Mutante [Nt(Nt:AbC2)] als Plastomdonor (vgl. Tab. 3-1 und 3-2). Die [Ab(Nt:NtC2)]-Cybriden (Kontrolle, F1CLN-3) und [Ab(Nt:AbC2)]-Cybriden (F2CLN-5) unterscheiden sich nicht von der ursprünglichen [Ab(Nt)]-Cybride (vgl. Abb. 3-1). Die *A. belladonna* spezifische Deletion im *N. tabacum* Plastom führt nicht zu photoautotrophem Wachstum in der [Ab(Nt:AbC2)]-Cybride (F2CLN-5). **C)** DNA Sequenzausschnitte für *rpoC2* und *ndhA* aus *A. belladonna* (Acc. Nr. AJ316582) und *N. tabacum* (Acc. Nr. Z00044) und Ausschnitte der Chromatogramme verschiedener Sequenzierungen der DNA aus den Cybriden F1CLN-3 (Kontrolle) und F2CLN-5 (*A. belladonna* spezifische Deletion). Für *ndhA* sind die Codons 95 und 108 gekennzeichnet. Unterschiede zwischen *N. tabacum* und *A. belladonna* sind durch Großbuchstaben gekennzeichnet. Beide Cybridenlinien besitzen *N. tabacum* Plastome (siehe *ndhA*), F2CLN-5 trägt die *A. belladonna* spezifische Deletion in *rpoC2*.

Eine entsprechende Kontrollpflanze mit Resistenzmarker, jedoch ohne *A. belladonna* spezifische Deletion wurden durch Rekombinationsereignisse im Bereich zwischen der Insertion/Deletion und der *aadA*-Kassette erhalten. Die Kontrollpflanze trägt also die *aadA*-Kassette im 3'-Bereich des *rpoC2*-Gens in Kombination mit der *N. tabacum* spezifischen Insertion. Der Genotyp dieser Kontrollpflanze (C2N) wurde mit [Nt(Nt:NtC2)] analog zu den in *rpoC2* modifizierten Linien [Nt(Nt:AbC2)] bezeichnet (Abb. 3-2 A, Tab. 3-1). Unter Standardgewächshausbedingungen bei 25°C und einem Tag/Nacht Rhythmus von 16/8 Stunden, zeigten sowohl die [Nt(Nt:AbC2)]-Linien als auch die Kontrollpflanze einen schwachen Phänotyp. Die Pflanzen wuchsen

photoautotroph auf Erde, waren aber etwas heller, als die zum Vergleich angezogenen Tabak Wildtyppflanzen. Die Wachstumsraten waren hingegen nahezu identisch zum Wildtyp (Abb. 3-2 A). Da die schwache phänotypische Ausprägung in der Kontrolllinie und den [Nt(Nt:AbC2)]-Linien identisch war, ist ein negativer Effekt der *aadA* Kasette an entsprechender Stelle im unmittelbaren 3'-Bereich des *rpoC2*-Gens wahrscheinlich.

3.1.1.2 Analyse von *Atropa belladonna* Cybriden mit in *rpoC2* modifiziertem *Nicotiana tabacum* Plastidengenom

Trotz der leichten phänotypischen Ausprägung wurden die Pflanzenlinien C2A [Nt(Nt:AbC2)] und C2N [Nt(Nt:NtC2)] für die folgenden somatischen Zellhybridisierungen (Cybridisierung) verwendet, in denen die jeweils modifizierten *N. tabacum* Plastidengenome mit dem *A. belladonna* Kerngenom kombiniert werden sollten. Eine Vergleichbarkeit hinsichtlich der Insertion/Deletion in *rpoC2* sollte aufgrund der sich identisch verhaltenden Kontrollpflanze gewährleistet sein. Alle somatischen Zellhybridisierungen wurden von Dr. Sergei Kushnir (Universität Gent, Belgien) durchgeführt. Als Plastidendonoren dienten für zwei unabhängige Protoplastenfusionierungen die *N. tabacum* *rpoC2*-Linien C2A-2 und C2A-9 (Fusion 2 und 3, im Weiteren F2 und F3). Für die *rpoC2*-Kontrollcybride [Ab(Nt:NtC2)] fand die *rpoC2*-Kontrollpflanze C2N Verwendung (Genotyp [Nt(Nt:NtC2)]); Fusion 1 = F1; Tab. 3-2). Als Kerndonor diente in allen drei Fällen die mit einem kernlokalisierten Kanamycin-resistenzmarker (*nptII*) ausgestattete, aber ansonsten vom Wildtyp nicht zu unterscheidende *A. belladonna* Linie, Ab5 (Kushnir *et al.* 1991, Tab. 3-1, Tab. 3-2). Nach der Protoplastenfusion wurden Kalli, die aus fusionierten Zellen hervorgegangen waren, weiter auf selektivem Regenerationsmedium (100 µg/ml Kanamycin, 1200 µg/ml Spektinomycin) kultiviert, um auf das entsprechende Kern- bzw. Plastidengenom zu selektieren. Sprosse aus unabhängigen Kalli, die Anthocyanakkumulation im Bereich der Sprossachse und haarlose Blätter aufwiesen, wurden anschließend auf nicht-selektivem Medium propagiert. Die selektierten phänotypischen Ausprägungen sind charakteristisch für den Kerngenomdonor *A. belladonna*.

Aus Fusion 1 (Kontrolle) gingen insgesamt 14 unabhängige Linien hervor, die zunächst alle einen albinotischen Phänotyp aufwiesen. Diese [Ab(Nt:NtC2)]-Cybriden

unterschieden sich somit phänotypisch nicht von den ursprünglichen [Ab(Nt)]-Cybriden. In den zwei Linien F1CLN-6 und -7 (CLN bezeichnet die Linie) entwickelten sich später auf nicht-selektivem Medium grüne Sektoren, welche sich nach einem weiteren Regenerationszyklus gegenüber dem weißen Gewebe durchgesetzt hatten. Aus den Fusionen F2 und F3 mit der *A. belladonna* spezifischen Deletion in *rpoC2* wurden jeweils 15 Linien propagiert, die alle über mehrere Regenerationszyklen weiß blieben und die *A. belladonna* typischen Merkmale aufwiesen. Diese Cybriden waren phänotypisch nicht von der ursprünglichen [Ab(Nt)]-Cybride (Kushnir *et al.* 1991) zu unterscheiden (Abb. 3-1 A, Abb. 3-2 B).

Tabelle 3-2: Cybriden mit *A. belladonna* Kerngenom und in *rpoC2* modifiziertem *N. tabacum* Plastom

Cybride	Fusion	Linien	Phänotyp	<i>rpoC2</i> Ab oder Nt	Protoplastenfusion Kerngenom(Plastom)	Bezeichnung
Ab(Nt:NtC2) Kontrolle	F1	14	albino ¹	Nt <i>rpoC2</i>	Nt(Nt:NtC2) + Ab(Ab) ↓ Ab(Nt:NtC2)	C2N + Ab5 ↓ F1CLN
Ab(Nt:AbC2)	F2	15	albino	Ab <i>rpoC2</i>	Nt(Nt:AbC2) + Ab(Ab) ↓ Ab(Nt:AbC2)	C2A-2 + Ab5 ↓ F2CLN
	F3	15	albino	Ab <i>rpoC2</i>	Nt(Nt:AbC2) + Ab(Ab) ↓ Ab(Nt:AbC2)	C2A-9 + Ab5 ↓ F3CLN

Bezeichnungen und Abkürzungen: vgl. Tab. 3-1; F1, F2, F3: unabhängige somatische Zellhybridisierungen; Linien: Anzahl der erhaltenen unabhängigen Linien; *rpoC2*: Ab- oder Nt-spezifische Deletion respektive Insertion in *rpoC2*; der Phänotyp korreliert nicht mit der Insertion/Deletion in *rpoC2* (vgl. Abb. 3-2); ¹ Linien F1CLN-6 und -7 grün: Genotyp [Ab(Ab)] entspricht dem Kerngenomdonor Ab5 (vgl. Tab. 3-3)

Die Analyse hinsichtlich der in den hergestellten Cybriden enthaltenen Plastidengenome erfolgte mittels PCR mit der Primerkombination *rpoC2*f2/*rpoC2*rev3' und anschließender direkter Sequenzierung der PCR-Produkte. Zusätzlich zur entsprechenden, die Insertion/Deletion einschließenden *rpoC2*-Region, wurde noch eine weitere Region aus dem Plastidengenom analysiert. So sollte sichergestellt werden, dass sich in den hergestellten Cybriden keine rekombinanten Plastidenchromosomen aus *A. belladonna* und den mutanten *N. tabacum* Pflanzen befanden. Bei der ausgewählten neutralen Region handelt es sich um einen Teil des plastidären *ndhA*-Gens (Primer: *ndhH3'*for/*ndhA.in.rev.RPA*), welches für eine Untereinheit des plastidären NDH-Komplexes kodiert und in einer anderen Region des Plastidenchromosoms als *rpoC2* liegt. Durch Sequenzierung konnten zwei Unterschiede zwischen *A. belladonna* und *N. tabacum* in Codon 95 (Ab: Cct; Nt: Act) und 108 (Ab: tcT; Nt: tcC) innerhalb des amplifizierten Bereiches überprüft werden.

Analysiert wurden jeweils drei Linien einer Fusion: für die Kontrollcybriden aus Fusion 1 waren dies die Linien F1CLN-2, -3 und 4; für die Cybriden mit der

A. belladonna spezifischen Deletion in *rpoC2* im *N. tabacum* Plastom waren es aus Fusion 2 die Linien F2CLN-1, -2 und -4 und aus Fusion 3 die Linien F3CLN-2, -3 und -4. Zusätzlich wurden die beiden aus Fusion 1 (Kontrolle) erhalten photoautotrophen Linien F1CLN-6 und -7 untersucht.

Die drei getesteten aus *A. belladonna* und [Nt(Nt:NtC2)] hervorgegangenen Kontrollcybriden (F1) hatten alle die *N. tabacum* spezifische Insertion in *rpoC2*, sowie ein *N. tabacum* spezifisches Cytidin vier Basen 5' der Insertion (Abb. 3-2 C, Tab. 3-3). Sie sollten sich also von der ursprünglichen Cybride nur durch die im 3' Bereich des *rpoC2*-Gens inserierte *aadA*-Kassette unterscheiden, deren Anwesenheit mittels PCR und durch Regenerationstests auf selektivem Medium für alle Linien nachgewiesen wurde (nicht gezeigt). Die Analyse speziesspezifischer Polymorphismen in *ndhA* zeigte bei keiner der drei Linien *A. belladonna* spezifische Sequenz in den erhaltenen Chromatogrammen (Abb. 3-2 C, Tab. 3-3). Die Analysen beweisen, dass alle hier erhaltenen albinotischen Linien *N. tabacum* Plastidengenome mit *aadA*-Kassette besitzen und somit Cybriden sind, die das Plastom der *N. tabacum* Kontrolllinie C2N des Genotyps [Nt(Nt:NtC2)] haben.

In den beiden ebenfalls aus Fusion 1 hervorgegangenen grünen Linien, F1CLN-6 und -7, war weder die *aadA*-Kassette (nicht gezeigt) noch *N. tabacum* spezifische Sequenz nachzuweisen (Tab. 3-3). Der Genotyp der photoautotrophen Linien, F1CLN-6 und -7, ist also [Ab(Ab)].

Alle aus Fusion 2 und 3 erhaltenen untersuchten albinotischen Linien stellten sich als Cybriden heraus, die ein *N. tabacum* Plastidengenom besaßen, jedoch das modifizierte an *aadA* gekoppelte *A. belladonna* spezifische *rpoC2* Fragment trugen (Abb. 3-2 C, Tab. 3-3).

Tabelle 3-3: Genotypisierung der Cybriden mit *A. belladonna* Kerngenom und in *rpoC2* modifiziertem *N. tabacum* Plastom

Fusion F	Linie CLN	Genotyp	<i>rpoC2</i> Indel	<i>ndhA</i>		Phänotyp
				95	108	
1	2	Ab(Nt:NtC2)	Nt	Nt	Nt	albino
1	3	Ab(Nt:NtC2)	Nt	Nt	Nt	albino
1	4	Ab(Nt:NtC2)	Nt	Nt	Nt	albino
1	6	Ab(Ab)	Ab	Ab	Ab	grün
1	7	Ab(Ab)	Ab	Ab	Ab	grün
2	1	Ab(Nt:AbC2)	Ab	Nt	Nt	albino
2	2	Ab(Nt:AbC2)	Ab	Nt	Nt	albino
2	4	Ab(Nt:AbC2)	Ab	Nt	Nt	albino
3	2	Ab(Nt:AbC2)	Ab	Nt	Nt	albino
3	3	Ab(Nt:AbC2)	Ab	Nt	Nt	albino
3	4	Ab(Nt:AbC2)	Ab	Nt	Nt	albino

Fusion: vgl. Tab. 3-2; Linie: analysierte Cybridenlinie; *rpoC2*: Ab- oder Nt-spezifische Deletion respektive Insertion in *rpoC2*; *ndhA*: Ab- oder Nt-spezifische Kodierung in Codon 95 und 108 von *ndhA*; F1CLN6 und -7 entsprechen in ihrem Genotyp und Phänotyp dem Kerngenomdonor Ab, es handelt sich dabei folglich nicht um Cybriden mit modifiziertem Nt Plastom

Die Eliminierung des Polymorphismus in *rpoC2* im *N. tabacum* Plastidengenom führt nicht zu photoautotrophem Wachstum der [Ab(Nt)]-Cybride. Somit kann die Insertion/Deletion in *rpoC2* nicht allein die Fehlentwicklung der Chloroplasten in der [Ab(Nt)]-Cybride erklären.

3.1.2 Identifizierung von Inkompatibilitätsfaktoren

Aufgrund der hohen Anzahl identifizierter Unterschiede zwischen den Plastidengenomen von *A. belladonna* und *N. tabacum* (Schmitz-Linneweber *et al.* 2002) war eine Untersuchung hinsichtlich ihres Einflusses auf die Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität, wie es für den Polymorphismus in *rpoC2* durchgeführt worden war, nicht möglich. Deshalb wurde versucht plastidäre Suppressormutationen zu induzieren, welche zu photoautotrophem Wachstum der [Ab(Nt)]-Cybride führen.

Die anschließende Identifizierung der Suppressormutationen konzentrierte sich dabei auf die identifizierten Unterschiede zwischen den Plastidengenomen (Schmitz-Linneweber *et al.* 2002).

3.1.2.1 Analyse von Suppressormutanten

Für die Mutagenese von [Ab(Nt)]-Cybriden wurden kleine Blattstücke von zwei unabhängigen [Ab(Nt)]-Cybridenlinien (Abw und Abw3, siehe Abb. 3-1 B und Tab. 3-1) aus *in vitro* Gewebekultur mit NMU (N-Nitroso-N-methylharnstoff) behandelt (Dr. Sergei Kushnir, Universität Gent, Belgien). NMU ist ein alkylierendes Agens welches einen stark mutagenen Effekt auf Chloroplasten-DNA hat (Hagemann 1982). Daneben sind jedoch auch Mutationen im Kerngenom zu erwarten. Im Anschluss an die Mutagenese wurde Sprosswachstum induziert und auf grüne Sprosse selektiert. Aus dieser Mutagenese gingen drei unabhängige, stabile Linien, AG1, AG2 und AG7, mit der Genomkomposition [Ab^m(Nt^m)] (hochgestelltes m = mutagenisiert) hervor (Abb. 3-1 B). Die Linien AG1 und AG2 waren über mehr als zehn Regenerationszyklen stabil, das heißt in keiner der beiden Linien entwickelten sich weiße Sektoren, was als Indiz für Homoplastomie anzusehen ist. Die Inkompatibilität, manifestiert in Chlorophylldefizienz, lässt sich also durch NMU induzierte Mutagenese supprimieren. Alle drei AG-Linien zeigten aber stark eingeschränkte Wachstumsraten in

Gewebekultur verglichen mit [Ab(Nt)]-Cybriden bzw. den Wildtypen. Höchstwahrscheinlich ist dies auf multiple nukleäre Mutationen zurückzuführen.

Um zu zeigen, dass die für die Suppression verantwortliche(n) Mutation(en) tatsächlich cytoplasmatischer Natur ist/sind, wurden weitere somatische Zellhybridisierungsexperimente gefolgt von Kreuzungen durchgeführt.

Zunächst wurden Plastidengenome aus Linie AG7 [Ab^m(Nt^m)] mittels somatischer Zellhybridisierung mit dem Kerngenom von *N. tabacum* kombiniert. Kerngenomdonor war eine aufgrund cytoplasmatischer Mutationen albinotische Tabaklinie A15 (Svab und Maliga 1986, Abb. 3-1 B, Tab. 3-1). Die erhaltenen Sprosse mit tabak-spezifischen Merkmalen und Genotyp [Nt(Nt^m)] waren grün (Linie L3/7, Abb. 3-1 B, Tab. 3-1). Rückkreuzungen weiblich fertiler L3/7-Linien durch Bestäubung mit Pollen des Tabak Wildtyps führten ausschließlich zu grünen Nachkommen. Die Mutationen im Tabakplastidengenom der Linie AG7 schränken die Funktionsfähigkeit im Kernhintergrund von Tabak also nicht ein. Ein weiterer Plastidentransfer in den *A. belladonna* Wildtyp-Kernhintergrund sollte bestätigen, dass die durch Mutagenese hervorgegangenen Plastidengenome tatsächlich mit dem Kerngenom von *A. belladonna* kompatibel sind und nicht Mutationen im Kerngenom der AG-Linien, [Ab^m(Nt^m)], für die Ergrünung verantwortlich waren. Als Kerngenomdonor wurde hierfür die albinotische [Ab(Nt)]-Linie Abw3 gewählt, um wiederum die Möglichkeit einer Selektion auf Photoautotrophie zu haben. Die selektierten Sprosse sollten also grün mit *A. belladonna* spezifischen Merkmalen sein. Die erhaltene Linie L3 vom Genotyp [Ab(Nt^m)] zeigte auf Erde unter Standardgewächshausbedingungen große Ähnlichkeit in Wuchsform und Wachstumsrate mit dem *A. belladonna* Wildtyp (Abb. 3-1 B, Tab. 3-1). Die Bestäubung dieser männlich sterilen Linie L3 mit Pollen des *A. belladonna* Wildtyps brachte ausschließlich photoautotroph wachsende Nachkommen hervor (nicht gezeigt). Nach solchen Rückkreuzungen ist es äußerst unwahrscheinlich, dass eventuell nach der Cybridisierung enthaltenes genetisches Material des *N. tabacum* Nukleus vorhanden ist. Dies wurde durch Tests auf artspezifische Kerngenommarker (Isoenzyme: Amylase, Peroxidase) und durch RFLP-Analysen bestätigt (durchgeführt von S. Kushnir, nicht gezeigt).

Es ist somit davon auszugehen, dass das Kerngenom der Linie L3 frei von Tabakmaterial ist und somit Mutationen im Plastidengenom für die Suppression des albinotischen Phänotyps ausschlaggebend sind. Weiter sind die reduzierten

Wachstumsraten in den [Ab^m(Nt^m)]-Linien tatsächlich auf nicht identifizierte nukleäre Mutationen zurückzuführen.

Die Identifizierung potentieller Suppressormutationen orientierte sich nun an den Polymorphismen zwischen den Plastidengenomen von *A. belladonna* und *N. tabacum* (Schmitz-Linneweber *et al.* 2002). Zu den auffälligsten Unterschieden zählten Nukleotidsubstitutionen an Positionen, die in einer der beiden Arten, als Edierungsstelle beschrieben waren (Schmitz-Linneweber *et al.* 2002). Für *N. tabacum* spezifische Edierungsstellen, *atpA*-264, *ndhD*-200, *ndhD*-225, *psbE*-72 und *rps14*-50, war gezeigt worden, dass diese in der Cybride, also im Kernhintergrund von *A. belladonna*, teilweise nicht korrekt prozessiert werden (Schmitz-Linneweber 2002). *atpA*-264, *ndhD*-200, *ndhD*-225 verbleiben unediert; *rps14*-50 wird im Gegensatz zu *N. tabacum* nur partiell ediert. Nicht betroffen ist *psbE*-72 (Abb. 3-3, Tab. 3-4 Schmitz-Linneweber 2002). Offensichtlich fehlen im *A. belladonna* Kerngenom funktionelle Allele für Edierungsfaktoren für drei *N. tabacum* spezifische Edierungsstellen, *atpA*-264, *ndhD*-200, *ndhD*-225. Die reduzierte Edierung in *rps14*-50 deutet eine Degenerierung des verantwortlichen Edierungsfaktors an.

Tabelle 3-4: Edierung *N. tabacum* spezifischer Edierungsstellen in verschiedenen Cybriden

Genotyp	Phänotyp	<i>Nicotiana tabacum</i> spezifische Edierungsstellen				
		<i>atpA</i> -264	<i>ndhD</i> -200	<i>ndhD</i> -225	<i>psbE</i> -72	<i>rps14</i> -50
		P → L cCc→cUc	S → L uCa→uUa	S → L uCg→uUg	P → S Ccu→Ucu	P → L cCa→cUa
Nt(Nt)	grün	+	+	+	+	+
Ab(Ab)	grün	T	T	T	T	T
Ab(Nt)	albino	-	-	-	+	+/-
AbNt(Nt)	grün	+	+	+	+	+
Ab ^{Nt} (Nt)	grün	+	-	+/-	+	+
Ab(Nt ^m)	grün	T	-	-	+	+/-
Ab(Nt:CTC)	grün	T	-	-	+	+/-
Ab(Nt:CCC)	albino	-	-	-	+	+/-

Genotyp: vgl. Tab. 3-1 und 3-5; *Nicotiana tabacum* spezifische Edierungsstellen: Gen und Codonposition aus Nt, Aminosäureübergang (P: Prolin; L: Leucin; S: Serin) mit Kodierung (Edierungsstelle als Großbuchstabe); +: Edierung; +/-: partielle Edierung; -: keine Edierung; T: T auf DNA (vgl. Abb. 3-3); der Phänotyp korreliert mit einem cUc Leucincodon in *atpA*-264, hergestellt durch Edierung oder bereits auf DNA kodiert

Die in der [Ab(Nt)]-Cybride von Edierungsdefekten betroffenen Positionen wurden in allen drei Suppressorlinien sequenziert, insgesamt je Linie ca. 1,5 Kb. Dabei wurde in allen drei Suppressorlinien nur eine, allen Linien gemeinsame Mutation in Codon 264 von *atpA* identifiziert. *atpA* kodiert für CF₁α, die α-Untereinheit der löslichen F₁-Untereinheit der plastidären F₀F₁-ATPase. Das ursprüngliche CCC Prolincodon 264, welches in *N. tabacum* durch RNA Edierung in ein CUC Leucincodon überführt wird, kodiert in den drei untersuchten AG-Linien bereits auf DNA-Ebene für das an dieser

Stelle konservierte Leucin (CTC). Dies entspricht der Situation in *A. belladonna*. Die anderen *N. tabacum* spezifischen Edierungsstellen waren nicht betroffen. In den drei AG-Suppressorlinien wurde innerhalb der sequenzierten Bereiche je Linie nur jeweils eine weitere Mutation identifiziert. Diese Mutationen waren jedoch hinsichtlich der Kodierung synonym und befanden sich in den unterschiedlichen AG-Linien an jeweils nicht-homologen Positionen (nicht gezeigt). Dies verdeutlicht zum einen die mögliche essentielle Rolle der Mutation in *atpA-264* für eine funktionelle Chloroplastendifferenzierung und beweist den unabhängigen Ursprung der drei Suppressorlinien AG1, AG2 und AG7.

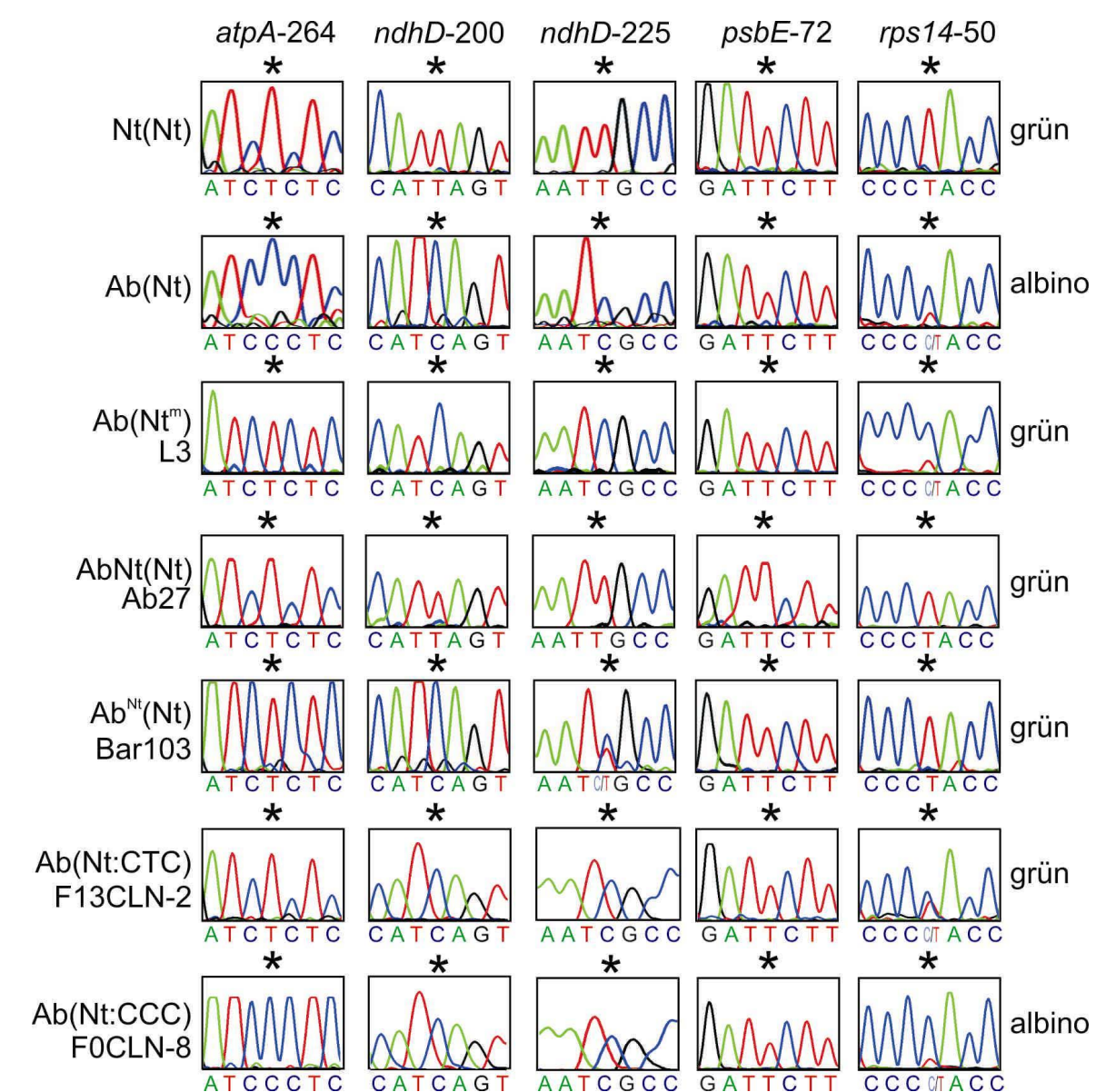


Abbildung 3-3

Abbildung 3-3: Edierung *N. tabacum* spezifischer Edierungsstellen in somatischen Hybriden
 cDNA Sequenzausschnitte *N. tabacum* spezifischer Edierungsstellen aus verschiedenen Cybridenlinien. Bezeichnungen und Genotypen der untersuchten Linien: Tab. 3-1 und Tab. 3-5; Phänotypen: Abb. 3-1 und Abb. 3-6; Überblick der Ergebnisse: Tab. 3-4. Die Edierungsstellen (*) sind mit Gen und Codonposition in *N. tabacum* bezeichnet. In allen photoautotroph wachsenden Linien ist der Edierungsdefekt der [Ab(Nt)]-Cybride in *atpA*-264 durch eine C zu T Mutation aufgehoben (L3 [Ab(Nt^m)] und F13CLN-2 [Ab(Nt:CTC)]) oder Edierung durch Introgression genetischen Materials aus dem *N. tabacum* Nukleus in das nukleäre Cybridengenom wiederhergestellt (Bar103 [Ab^{Nt}(Nt)]).

Wie schon die oben aufgeführten Ergebnisse eine Bedeutung der Insertion/Deletion in *rpoC2* für den Albinismus der [Ab(Nt)]-Cybride unwahrscheinlich machen, ist es ebenso unwahrscheinlich, dass die NMU-vermittelte Mutagenese zu einer Deletion genau der neun Nukleotide im Plastom von *N. tabacum* führt. Trotzdem wurde die entsprechende Region aus den Plastidengenomen der drei Suppressorlinien (AG1, AG2 und AG7) mittels PCR amplifiziert (Primer *rpoC2f2/rpoC2rev3'*) und das Produkt direkt sequenziert. Alle erhaltenen Ergebnisse zeigten ausschließlich *N. tabacum* spezifische Sequenz (nicht gezeigt). Die Insertion/Deletion in *rpoC2* war somit nicht für die funktionelle Chloroplastendifferenzierung in den Suppressormutanten verantwortlich.

3.1.2.2 Analyse von Hybriden und partiellen Hybriden

Ein hybrides Kerngenom aus *A. belladonna* und *N. tabacum* führt in Verbindung mit dem *N. tabacum* Plastom zu Pflanzen, die photoautotrophes Wachstum zeigen (Linie Ab27, Genotyp [AbNt(Nt)], Abb. 3-1 A, Tab. 3-1). Diese Hybriden wurden hinsichtlich der Edierung der *N. tabacum* spezifischen Edierungsstellen (*atpA*-264, *ndhD*-200, *ndhD*-225, *psbE*-72 und *rps14*-50) analysiert. Alle fünf Edierungsstellen wurden wie im *N. tabacum* Wildtyp vollständig prozessiert (Abb. 3-3, Tab. 3-4). Die Edierungsfaktoren werden also vom hybriden Zellkern bereitgestellt und funktionsfähig in die Plastiden importiert, was mit der Fähigkeit zu photoautotrophem Wachstum einhergeht.

Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass in Ab27 [AbNt(Nt)] nicht nur die Edierungsfaktoren vom hybriden Zellkern den Plastiden zur Verfügung gestellt werden, sondern auch sämtliche andere Faktoren, die für ein funktionierendes Gesamtsystem verantwortlich sind. Deshalb wurden photoautotroph wachsende partielle Hybriden mit *A. belladonna* Kerngenom und unvollständigem *N. tabacum*

Kerngenom in Verbindung mit dem *N. tabacum* Plastom generiert und diese hinsichtlich der Edierung der *N. tabacum* spezifischen Edierungsstellen untersucht.

Zur Herstellung von Cybriden können die Zellen des Plastidendonors vor der Protoplastenfusion ionisierender Strahlung ausgesetzt werden, was zu Chromosomenbrüchen und im weiteren Verlauf zum vollständigen Verlust des entsprechenden Kerngenoms führt (Menczel *et al.* 1982). Als Plastidendor, der nun auch Teile des Kerngenoms liefern sollte, wurde in diesem Fall die Glufosinat-Ammonium-resistente (BASTA-resistente) *N. tabacum* Linie BarD gewählt (Abb. 3-1 C, Tab. 3-1). Nach Bestrahlung der Protoplasten mit einer letalen Dosis γ -Strahlen (500 Gy) wurden diese mit [Ab(Nt)]-Cybriden (Abw3) fusioniert. Dem vollständigen Verlust des *N. tabacum* Kerngenoms wurde durch Selektion auf BASTA-Resistenz begegnet und grüne Regenerate gegen phänotypische Merkmale von Tabak (Blatthaare, Blattform, keine Wurzelpigmentierung) selektiert. Die erhaltene Linie Bar103 (Abb. 3-1 C, Tab. 3-1) sollte den Genotyp [Ab^{Nt}(Nt)] (hochgestelltes Nt = unvollständiges Tabakkerngenom) besitzen und zeigte eine für *A. belladonna* typische Spross- und Blattmorphologie sowie pigmentierte Wurzeln. Die Fähigkeit zu photoautotrophem Wachstum blieb *in vitro* über mehrere Jahre ohne Selektionsdruck erhalten. Alle Rückkreuzungen mit Pollen des *A. belladonna* Wildtyps führten jedoch ausnahmslos zu weißen, nicht photoautotroph wachsenden Nachkommen. Die Plastiden werden hier maternal vererbt. Das Plastom der F1-Generation unterscheidet sich somit nicht von dem der partiellen Hybride [Ab^{Nt}(Nt)]. Zu erklären ist der albinotische Phänotyp somit durch einen Verlust der Fragmente des Tabakkerngenoms während der Meiose. Die Akkumulation von Chlorophyll in den asymmetrischen Hybriden, [Ab^{Nt}(Nt)], ist folglich nukleären und nicht plastidären Ursprungs.

Die Analyse der tabakspezifischen Edierungsstellen in der partiellen Hybride Bar103 [Ab^{Nt}(Nt)] zeigte drei Unterschiede im Vergleich zur [Ab(Nt)]-Cybride. Zwei davon betrafen die im reinen *A. belladonna* Kernhintergrund nicht edierten Stellen in *atpA*-264 und *ndhD*-225, der dritte fand sich an der in den [Ab(Nt)]-Cybriden partiell edierten Stelle in *rps14*-50. In Codon *atpA*-264 war die Edierung vollständig hergestellt, *ndhD*-225 wurde partiell ediert und *rps14*-50 war voll ediert (Abb. 3-3, Tab. 3-4). Die in [Ab(Nt)] nicht edierte Stelle in Codon *ndhD*-200 verblieb unediert. Es scheint sich bei Bar103 also tatsächlich um eine partielle Hybride zu handeln, die nicht das vollständige Kerngenom des Tabaks besitzt, da sonst alle Edierungsstellen

voll ediert erwartet würden, wie es in der Hybride Ab27 (Genotyp: [AbNt(Nt)]) der Fall ist (Abb. 3-3, Tab. 3-4).

Die erfolgreiche Introgression von mindestens einem der im *N. tabacum* Kerngenom kodierten Edierungsfaktoren geht einher mit der Komplementation des albinotischen Phänotyps der [Ab(Nt)]-Cybride. Betroffen ist, wie bereits in den durch NMU Mutagenese erhaltenen photoautotrophen AG-Cybridenlinien [Ab^m(Nt^m)], unter anderem das Codon 264 (CCC) in *atpA*, welches nun wie in *N. tabacum* durch Edierung in das konservierte Leucin Codon (CUC) überführt wird (Abb. 3-3, Tab. 3-4).

3.1.3 Revers genetische Analyse der identifizierten Aminosäureposition 264 in *atpA*

Die Möglichkeiten Edierungsdefekte von nukleärer Seite zu untersuchen sind eingeschränkt. Zum einen ist erst ein an Edierung beteiligter Spezifitätsfaktor für die Edierungsstelle *ndhD-1* identifiziert (Kotera *et al.* 2005) und zum anderen sind für das Tabakkerngenom nur wenig Sequenzdaten zugänglich. Eine Analysemöglichkeit bietet im vorliegenden Fall, im Gegensatz zu anderen Systemen, die zielgerichtete Transformierbarkeit des Plastidengenoms von *N. tabacum*. Die revers genetische Analyse zur funktionellen Relevanz der Edierung in Codon 264 in *atpA* erfolgte also von plastidärer Seite.

3.1.3.1 Analyse transplastomischer *Nicotiana tabacum* Linien mit verändertem *cis*-Element der Edierungsstelle *atpA*-264 (mA)

Durch Edierung veränderte Serincodons (UCN zu UUN) bieten die Möglichkeit Edierungsdefekte auf relativ einfache Weise zu untersuchen. Ein durch AGY ersetztes TCN Serincodon kann nicht mehr durch C-U Edierung konvertiert werden. Die daraus resultierende mRNA entspricht also in ihrer Kodierung der unedierten Form. Bei Prolincodons, wie im zu untersuchenden Fall, ist es nicht möglich durch Mutation des Codons einen Edierungsdefekt zu imitieren. Alle Prolincodons (CCN) werden durch Edierung an der zweiten Position in ein Leucin Codon (CUN) überführt. Ein Edierungsdefekt sollte somit durch Mutagenese des für die Spezifitätsfaktorbindung mutmaßlich verantwortlichen proximalen *cis*-Elements der Edierungsstelle

herbeigeführt werden. Es ist bekannt, dass bereits der Austausch einzelner Nukleotide innerhalb des *cis*-Elements zum Verlust von Edierung führen kann (vgl. 1.1.3.2.3). Hier wurden im Bereich -19 bis +1 (Edierungsstelle = 0), innerhalb des putativen *cis*-Elements, acht synonyme Mutation eingefügt (Abb. 3-4 A).

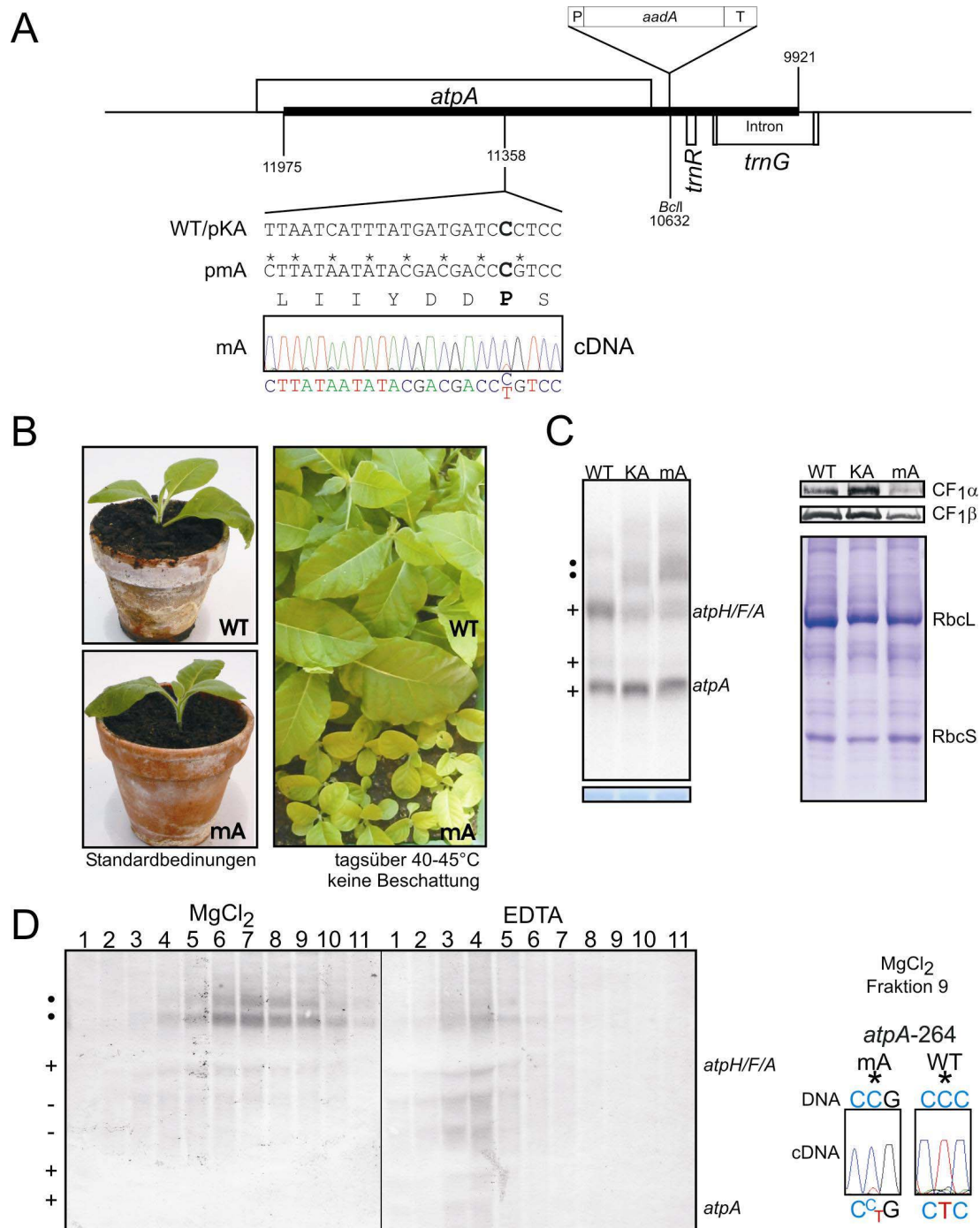


Abbildung 3-4: Mutagenese des putativen *cis*-Elements der Edierungsstelle *atpA*-264

A) Genkarte und Konstruktbeschreibung für die Mutagenese des *cis*-Elements der Edierungsstelle *atpA*-264 in *N. tabacum*. Die dicke Linie kennzeichnet das Konstrukt mit der *aadA*-Kassette im 3'-Bereich des *atpA* Gens. Über der Linie eingezeichnete Gene werden von links nach rechts, unter der Linie liegende Gene von rechts nach links abgelesen. Die angegebenen Nukleotidpositionen beziehen sich auf das *N. tabacum* Plastom (Acc. Nr. Z00044). Die DNA Sequenzen zeigen die Wildtypsequenz (WT) sowie die eingefügten, durch Sterne gekennzeichneten Mutationen im pmA-Konstrukt. pKA

bezeichnet das Kontrollkonstrukt ohne Mutation, aber mit Resistenzmarker *aadA* im 3'-Bereich von *atpA*. Die Aminosäuresequenz (Einbuchstabencode) bleibt durch die eingeführten Mutationen unverändert. Das fettgedruckte C stellt die Edierungsstelle dar. Edierung führt im *N. tabacum* Wildtyp zu einer P (CCC) zu L (CUC) Konversion. Aus Gesamt-RNA hergestellte cDNA zeigt stark reduzierte Edierung in *atpA*-264 für die mA-Linie im Vergleich zum Wildtyp (vgl. Abb. 3-3). **B)** Phänotyp der *N. tabacum* mA-Mutanten. Fünf bis sechs Wochen alte Pflanzen zeigen unter Standardbedingungen keinen Phänotyp (links). Direktes Sonnenlicht und die Erhöhung der Temperatur auf tagsüber 40-45°C führen zu eingeschränkten Wachstumsraten und einem hellgrünen Phänotyp der mA-Mutanten (rechts). **C)** Links: Northernanalyse mit *atpA*-spezifischer Einzelstrangsonde auf Gesamt-RNA des Wildtyps, der Kontrolllinie (KA) und der mA-Mutante. +: Wildtyp-spezifische Transkripte des polycistronisch transkribierten *rps2/atpH/H/F/A*-Operons; •: *aadA*-spezifische Fragmente; als Ladekontrolle dient eine Methylenblaufärbung der Membran, der Ausschnitt zeigt die 16S rRNA. Während das monocistronische *atpA*-Transkript in allen Linien ähnlich akkumuliert, ist für das tricistronische Transkript eine verringerte Akkumulation zugunsten der *aadA*-spezifischen Fragmente zu erkennen. Rechts: Westernanalyse auf Gesamtproteinisolat des Wildtyps, der Kontrolllinie (KA) und der mA-Mutante. Als Ladekontrolle diente eine Coomassiefärbung; gekennzeichnet sind die grosse (RbcL) und kleine (RbcS) Untereinheit der Rubisco. Die Akkumulation von CF₁ α ist in der mA-Mutante stark reduziert. CF₁ β ist in der mA-Mutante ebenfalls reduziert, aber in geringerem Ausmaß. **D)** Links: Northernanalyse mit *atpA*-spezifischer Doppelstrangsonde auf Polysomenfraktionen 1-11 der mA-Mutante (nummeriert von oben nach unten) aus einem MgCl₂-Gradienten (linke Hälfte) und einem EDTA-Gradienten (rechte Hälfte). EDTA führt zur Freisetzung der RNA aus den Ribosomen und so zu einer verminderten Migration im Saccharosegradienten. Detektierte Fragmente sind gekennzeichnet wie in C); -: unspezifische Kreuzhybridisierungen der Doppelstrangsonde mit der 23S rRNA und einem Bruchstück dieser. Monocistronisches *atpA*-Transkript ist nur in Fraktionen des EDTA-Gradienten nachzuweisen. Tricistronisches *atpH/F/A*-Transkript kann im MgCl₂-Gradient bis Fraktion 10 detektiert werden, im EDTA-Gradient aber nur bis Fraktion 5. Rechts: Edierungsstatus ribosomenassoziierten *atpA*-Transkripts der mA-Mutante im Vergleich zum *N. tabacum* Wildtyp (WT). Der Sequenzausschnitt zeigt das *atpA*-264 Codon der analysierten cDNA der mA-Mutante aus Fraktion 9 des MgCl₂-Gradienten und der cDNA des Wildtyps aus einer äquivalenten Gradientenfraktion eines parallel durchgeführten Experiments (nicht gezeigt). Die Edierungsstelle ist mit einem Stern gekennzeichnet. Während im Wildtyp ausschließlich ediertes *atpA*-Transkript detektiert wird, überwiegt bei der mA-Mutante der Anteil unedierten *atpA*-Transkripts (C-Signal), ähnlich wie in aus Gesamt-RNA hergestellter cDNA (vgl. A).

Für das Kontrollkonstrukt wurde die entsprechende Region des Plastidengenoms aus *N. tabacum* Gesamt-DNA mit den Primern HindatpAfor und HindtrnGrev amplifiziert, mittels der eingefügten *HindIII* Schnittstellen in pBluescript SKII- (Stratagene, Heidelberg) kloniert und im Anschluß die *aadA* Kasette in gleicher Orientierung wie *atpA* in die *BclI* Schnittstelle eingefügt (Abb. 3-4 A). Der erhaltene Vektor wurde mit pKA bezeichnet. Die Mutagenese erfolgte mittels PCR auf *N. tabacum* Gesamt-DNA. Zunächst wurden die Mutationen mit zwei PCRs mit den Primerpaaren atpHF6/muedatpArev und AT7atpA/muedatpAfor eingeführt. Ein zweiter PCR-Schritt auf die beiden überlappenden Fragmente mit den flankierenden Primern atpHF6 und AT7atpA ergab ein Fragment, durch welches über die Restriktionsschnittstellen *BshTI* und *Mva1269I* das wildtypspezifische Fragment aus pKA ersetzt werden konnte. Der so erhaltene Vektor wurde mit pmA bezeichnet. Nach der Plastidentransformation konnte eine mutante Linie (mA) isoliert werden. Für diese mA-Linien, sowie die erhaltenen Kontrolllinien (KA) wurde Homoplastomie mittels Southernanalyse bestätigt (nicht gezeigt).

Die Analyse der Edierungsstelle in *atpA*-264 zeigte, dass die Mutagenese des potentiellen *cis*-Elements nicht zum vollständigen Verlust der Edierung führt. Im Chromatogramm einer Sequenzierung der entsprechenden cDNA ist ein deutliches T-Signal zu erkennen, das von der edierten Form des *atpA*-Transkript herrührt (Abb. 3-4 A). Der Spezifitätsfaktor scheint somit noch ausreichende Affinität zur Edierungsstelle mit mutagenisiertem *cis*-Element zu besitzen, um Teile der Transkriptpopulation edieren zu können.

Unter Standardbedingungen in Gewebekultur und auf Erde zeigten die in der Edierung der *atpA*-264 Stelle eingeschränkten mA-Linien, wie die Kontrollpflanzen (KA), keinen Phänotyp (Abb. 3-4 B). Unter stark selektiven Bedingungen ließ sich aber ein Phänotyp provozieren. Hierzu wurden Wildtyp- und mA-Samen in der selben Schale sehr dicht auf Erde ausgebracht und nach Keimung die Beschattung im Gewächshaus geöffnet und die Temperatur tagsüber auf 40 - 45°C erhöht. In den ersten zwei Wochen (inklusive Keimung) waren die Unterschiede zwischen Wildtyp und mA marginal, ab etwa der dritten Woche zeigte sich jedoch ein klar eingeschränktes Wachstum der mA Pflanzen in Verbindung mit einem hellgrünen Phänotyp. Pflanzen der Kontrolllinie KA waren auch unter erhöhter Temperatur und direkter Sonneneinstrahlung nicht vom Wildtyp zu unterscheiden (nicht gezeigt). Die sequenzierte cDNA der Kontrolllinie KA zeigte vollständige Edierung in *atpA*-264 (nicht gezeigt), was die *aadA*-Kassette als Auslöser der beobachteten Verminderung der Edierungseffizienz, sowie den damit einhergehenden konditionalen Phänotyp ausschließt. Zudem zeigen die Ergebnisse der KA-Linie, dass die Prozessierungseffizienz der Edierungsstelle *atpA*-264 nicht temperaturabhängig ist.

Partielle Edierung kann auch auf einer Überexpression der betroffenen Edierungsstelle beruhen. Hierdurch kann der entsprechende Edierungsfaktor titriert werden, so dass Teile der Transkriptpopulation unediert bleiben. Um eine Überexpression aufgrund der eingeführten Mutationen und/oder der *aadA*-Kassette ausschließen zu können, wurden durch Northernanalysen die Transkriptmengen des Wildtyps, der Kontrolllinie (KA) und der mA-Mutante relativ zueinander bestimmt (Abb. 3-4 C). Die verwendete Sonde umfasste den Bereich des *N. tabacum* Plastidengenoms (Acc. Nr. Z00044) von Position 11.143 bis 12.134. Die Transkriptmengen von Wildtyp, KA und mA waren nahezu identisch, lediglich der Anteil an vermutlich tricistronischem

atpH/F/A-Transkript auf der Höhe von ca. 3 Kb erscheint im Wildtyp etwas dominanter. Dabei handelt es sich um ein Zwischenprodukt, das während der komplexen Reifung des *rps2/atpH/F/A*-Operons entsteht (Miyagi *et al.* 1998). Dieser relative Unterschied in der Transkriptmenge der tricistronischen Form ist vermutlich auf die direkt im 3' Bereich des *atpA*-Gens eingebrachte *aadA*-Kassette zurückzuführen (Abb. 3-4 A). Darin sollte auch der Grund für die sich zwischen Wildtyp- und Mutantenlinien unterscheidenden Transkriptmuster liegen (Abb. 3-4 C).

Die anschließende Westernanalyse sollte Aufschluss geben, ob die Teiledierung in mA-Pflanzen Einfluss auf die akkumulierte Proteinmenge hat. Die Signale des verwendeten CF₁ α Antikörpers waren für mA im Vergleich zum Wildtyp und der Kontrolllinie KA stark reduziert. Auch die Akkumulation des direkten Interaktionspartners CF₁ β war reduziert – wenn auch in geringerem Ausmaß (Abb. 3-4 C). Die partielle Edierung führt also zu einer verminderten Verfügbarkeit von Komponenten der plastidären F₀F₁-ATPase.

Für die [Ab(Nt)]-Cybride ist eine Reduktion von CF₁ α bis unter die Detektionsgrenze beschrieben (Schmitz-Linneweber 2002). Interessant erschien somit die Frage, ob unediertes Transkript, wie es in der [Ab(Nt)]-Cybride ausschließlich vorliegt, überhaupt translatiert wird, oder ob der Edierungsdefekt möglicherweise dazu führt, dass unediertes Transkript nicht translationskompetent ist. Eine direkte Untersuchung in der [Ab(Nt)]-Cybride erschien hierfür nicht möglich, da *atpA*-Transkripte in der Cybride nur in sehr geringem Ausmaß akkumulieren (Schmitz-Linneweber 2002, vgl. 3.1.3.2 und Abb. 3-5 F). Deshalb wurden RNA-Extrakte aus mA-Pflanzen untersucht. Die Translation der *atpA* mRNA wurde dabei indirekt über die Beladung mit Ribosomen analysiert. mRNAs werden dabei in Abhängigkeit ihrer Beladung mit Ribosomen mittels Ultrazentrifugation in einem Saccharosegradient getrennt. Um Fraktionen zu identifizieren, welche mit Ribosomen beladene mRNAs enthalten, wurden parallel mit EDTA behandelte Proben analysiert. In Gegenwart von EDTA dissoziieren Ribosomen von der mRNA, was zu einer verminderten Migration der mRNA im Saccharosegradient führt.

Interessanterweise dominierten in den Polysomenfraktionen der mA-Linien tricistronische *atpH/F/A*-Transkripte (Abb. 3-4 D). Dies war ebenso für den Wildtyp von *N. tabacum* zu beobachten (nicht gezeigt). Die Möglichkeit, dass das tricistronische Transkript die bevorzugt translatierte Form darstellen könnte, wurde

jedoch nicht weiter untersucht. Während *atpA*-Transkripte mittels Northernanalyse im MgCl_2 -Gradient bis in Fraktion 10 eindeutig nachzuweisen waren, konnte für die mit EDTA behandelten mRNA-Extrakte ab Fraktion 8 kein spezifisches Signal für *atpA* detektiert werden (Abb. 3-4 D). Da sich in Fraktion 9 des MgCl_2 -Gradienten somit ausschließlich ribosomenassoziiertes *atpA*-Transkript befinden sollte, wurde diese Fraktion zur Analyse des Edierungsstatus der *atpA*-Transkripte ausgewählt. Die Sequenzierung der cDNA aus der aus Fraktion 9 des MgCl_2 -Saccharosegradienten isolierten RNA zeigte, dass der überwiegende Anteil der polysomenassoziierten *atpA*-mRNA unediert war, ähnlich zu dem Ergebnis für Gesamt-RNA (Abb. 3-4 A, D). Das bedeutet, dass es keinen Mechanismus zur Unterscheidung zwischen „richtiger“ und „falscher“ mRNA im Bezug auf den Edierungsstatus vor der Translation zu geben scheint. Zumindest ist dies für den artifiziell herbeigeführten partiellen Edierungsdefekts in den mA-Linien der Fall. Der Edierungsdefekt wirkt sich somit nicht direkt auf die Translation aus. Wahrscheinlicher ist eine Degradierung des nicht funktionellen Polypeptids.

Die phänotypische Ausprägung der mA-Mutante ist verglichen zum Albinismus der [Ab(Nt)]-Cybride wesentlich schwächer, die vorliegenden Ergebnisse deuten jedoch eine essentielle Funktion der betroffenen Aminosäure in AtpA an.

3.1.3.2 Analyse von *Nicotiana tabacum* Linien mit einer Prolin zu Tryptophan Substitution in *atpA*-264 (WAT)

Da durch die Mutagenese der *cis*-Bindestelle ein vollständiger Edierungsdefekt in *atpA*-264, wie er in den [Ab(Nt)]-Cybriden auftritt, nicht erreicht werden konnte, sondern die vorhandene Transkriptmenge edierter mRNA offensichtlich für photoautotrophes Wachstum genügt, wurde versucht den Edierungsdefekt durch eine P264W Codonsubstitution in *atpA* zu simulieren. Das CCC Prolincodon wurde durch PCR-Mutagenese (Primer: WatpAfor, WatpArev) im Kontrollvektor pKA wie für mA beschrieben (siehe 3.1.3.1) durch ein TGG Tryptophancodon ersetzt und der erhaltene Vektor, pWAT, für die Plastidentransformation verwendet (Abb. 3-5 A). Die entsprechenden Pflanzenlinien des Genotyps [Nt(Nt:TGG)] wurden analog zum Transformationsvektor mit WAT benannt. Der Nachweis der eingeführten Mutation im *N. tabacum* Plastom erfolgte durch eine Restriktionsanalyse eines mit den Primern

EcoatpAfor und EcoatpArev erhaltenen, das Codon 264 in *atpA* überspannenden, PCR-Produktes der Länge von 224 Bp. Während das wildtypspezifische PCR-Produkt durch *MnII* endonukleolytisch in zwei 109 Bp und 115 Bp lange Fragmente gespalten wird, verbleibt das für die eingefügte Mutation spezifische PCR-Produkt unrestringiert. Die Regenerate wiesen zunächst panaschierte Blätter auf, deren weiße Sektoren homoplastomisch für die Mutation waren (Abb. 3-5 B, C). In grünem Blattgewebe war neben dem mutantenspezifischen Signal noch wildtypspezifisches Signal zu detektieren (Abb. 3-5 B, C). Die Regeneration neuer Pflanzen aus weißen Sektoren unter Selektion auf Spektinomycinresistenz führte zu vollständig weißen WAT-Linien, die sich homoplastomisch für die Mutation zeigten und die *aadA*-Kassette korrekt inseriert hatten (Abb. 3-5 C, D). Die Anwesenheit des Tryptophan-codons an Position 264 wurde durch Sequenzierung bestätigt (nicht gezeigt). Der Austausch des nach Edierung vorhanden Leucin Codons gegen Tryptophan (*AtpA* L264W) ist ausreichend, um einem albinotischen Phänotyp herbeizuführen.

Abbildung 3-5: Prolin zu Tryptophan Mutagenese in Codon 264 von *atpA*

A) Genkarte und Konstruktbeschreibung wie in Abb. 3-4. Das *atpA*-264 CCC Prolin Codon (WT/pKA) ist im pWAT-Konstrukt durch ein TGG Tryptophancodon (W) ersetzt. **B)** Phänotyp der Kontrolllinie KA sowie einer WAT-Mutante in hetero- und homoplastomischem Zustand. Linkes Bild: Kontrolllinie KA-7; mittleres Bild: heteroplastomische, variierte Mutante WAT-9; rechtes Bild: homoplastomische, albinotische Mutante WAT-9. **C)** Restriktionsanalyse verschiedener WAT-Linien. Das wildtypspezifische PCR-Produkt auf DNA (Primer: Efor=EcoatpAfor/Erev=EcoatpArev) wird mittels *MnII* Restriktion in zwei 109 und 115 Bp große Fragmente geteilt (als eine Bande sichtbar), während im mutantenspezifischen PCR-Produkt die Restriktionsschnittstelle durch die Einführung der Mutationen verloren geht. M: Marker; P: PCR Positivkontrolle auf Transformationsvektor pWAT; KA-7: Kontrolllinie; WAT: unterschiedliches Gewebe aus diversen Linien; N: PCR Negativkontrolle. Die Kontrolllinie KA-7 zeigt Wildtyp-spezifisches Signal. Für die WAT-Linien sind sowohl heteroplastomische, als auch homoplastomische Stadien unterschiedlichen Gewebes aus unterschiedlichen Linien gezeigt. **D)** PCR basierte Analyse der Integration der *aadA*-Kassette mit den Primerpaaren P1/P2 und P3/P4. **E)** Elektronenmikroskopische Aufnahme von Plastiden des *N. tabacum* Wildtyps (links), einer WAT-Mutante (Mitte) und einer [Ab(Nt)]-Cybride (rechts, zur Verfügung gestellt von C. Schmitz-Linneweber). G: Grana; Pg: Plastoglobuli; M: Mitochondrien; V: Vesikel; Z: Zellwand. Die für Chloroplasten charakteristischen Thylakoidmembranstrukturen fehlen sowohl in der WAT-Mutante als auch in der [Ab(Nt)]-Cybride. Anstatt dessen finden sich große vesikuläre Strukturen, die die Plastide nahezu ausfüllen. **F)** Northernanalyse der [Ab(Nt)]-Cybride, der WAT-Mutante sowie der Kontrolllinie (KA) im Vergleich zum *N. tabacum* Wildtyp. Als Ladekontrolle diente eine Methylenblaufärbung der Membran, der Ausschnitt zeigt die 16S rRNA. Das monocistronische *atpA*-Transkript ist in den albinotischen Linien stark reduziert, während es in der untersuchten Kontrollpflanze vergleichbar zum Wildtyp akkumuliert. **G)** Westernanalyse aller in der Northernanalyse (vgl. F) untersuchten Pflanzenlinien mit Antiseren gegen CF₁ α (*AtpA*) sowie Untereinheiten der Photosysteme I und II (PsaC und PsbE) und des Cytochrom b₆f Komplexes (PetA). In allen albinotischen Pflanzen ist die Akkumulation der untersuchten Untereinheiten verschiedener Thylakoidmembrankomplexe bis unter die Detektionsgrenze reduziert. Die Kontrolllinie verhält sich wie der *N. tabacum* Wildtyp.

Neben dem albinotischen Phänotyp der WAT-Mutante zeigten auch ultrastrukturelle Merkmale große Ähnlichkeit zur [Ab(Nt)]-Cybride. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mesophyllzellen einer albinotischen WAT-Linie wiesen die gleichen Charakteristika auf, wie die der [Ab(Nt)]-Cybride (Abb. 3-5 E, Herrmann *et al.* 2003). Im Vergleich zum *N. tabacum* Wildtyp ist das Thylakoidmembransystem völlig zerstört. Im Wildtyp sind elektronendichte Strukturen, die das für den Chloroplasten typische Membransystem inklusive Granastapeln zeigen, klar zu erkennen. Die *N. tabacum* WAT-Mutante zeigt jedoch wie die [Ab(Nt)]-Cybride große Vesikel, die möglicherweise rudimentäre Thylakoide darstellen. Die Anhäufung von Plastoglobuli erscheint im Vergleich zur [Ab(Nt)]-Cybride etwas geringer zu sein, unterscheidet sich jedoch deutlich vom *N. tabacum* Wildtyp (Abb. 3-5 E). Auch der ultrastrukturelle Phänotyp der WAT-Mutanten ist also mit dem der [Ab(Nt)]-Cybride nahezu identisch.

Northernanalysen zeigten, dass monocistronisches *atpA*-Transkript in den WAT-Linien 7 und 9 wie in der [Ab(Nt)]-Cybride, im Vergleich zum *N. tabacum* Wildtyp, stark reduziert war (Abb. 3-5 F). In der Kontrolllinie KA akkumulierte eine dem Wildtyp vergleichbare Transkriptmenge für *atpA* (Abb. 3-5 F). Die eingebrachte *aadA*-Kassette scheidet somit als Ursache für die reduzierte Transkriptakkumulation in den *N. tabacum* WAT-Mutanten aus. Die Transkriptakkumulation von *aadA* selbst ist in der grünen Kontrolllinie KA und in albinotischen WAT-Mutanten gleich (nicht gezeigt). Eine generell gestörte Transkription in den mutanten *N. tabacum* Linien kann somit ausgeschlossen werden. Die Reduktion monocistronischen *atpA*-Transkripts in der albinotische *N. tabacum* WAT-Mutante beruht somit wahrscheinlich auf der gleichen – nicht näher untersuchten – Ursache wie in der [Ab(Nt)]-Cybride.

CF₁α war in Westernanalysen weder für die albinotischen WAT-Linien, noch für die [Ab(Nt)]-Cybride nachweisbar (Abb. 3-5 G, vgl.: Schmitz-Linneweber 2002). Für einzelne Untereinheiten anderer Thylakoidmembrankomplexe ergab sich das gleiche Resultat. Sowohl PsuC und PsbE der Photosysteme I respektive II, als auch PetA des Cytochrom b₆f Komplexes zeigten sich einhergehend mit dem albinotischen Phänotyp bis auf eine nicht mehr detektierbare Menge reduziert (Abb. 3-5 G). In Folge einer offensichtlich in ihrer Funktion gestörten Thylakoid-ATPase kommt es also in der *N. tabacum* WAT-Mutante und der [Ab(Nt)]-Cybride zu einem Verlust aller für die Photosynthese essentieller Hauptkomplexe der Thylakoidmembran.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Transkript- und Proteinakkumulation in der *N. tabacum* WAT-Mutante und der [Ab(Nt)]-Cybride nahezu identisch sind. Auch die ultrastrukturellen Merkmale zwischen der *N. tabacum* WAT-Mutante und der [Ab(Nt)]-Cybride sind kaum zu unterscheiden. Das vollständige Fehlen von Thylakoidmembranstrukturen macht photoautotrophes Wachstum in beiden Fällen unmöglich. Tryptophan an Aminosäureposition 264 in AtpA führt in den *N. tabacum* WAT-Mutanten also zu einem nahezu identischen Phänotyp, wie er für die [Ab(Nt)]-Cybride beobachtet wird.

3.1.3.3 Analyse von Cybriden mit einem Prolin zu Leucin Austausch in *atpA*-264 im Plastom von *Nicotiana tabacum* [(Ab(Nt):CTC)]

Alle bis hierher geschilderten Ergebnisse deuten auf eine entscheidende Rolle des Edierungsdefekts in *atpA*-264 für die Inkompatibilität zwischen *A. belladonna* Kerngenom und *N. tabacum* Plastom hin. Ob der Albinismus in diesem Fall jedoch durch die Beseitigung allein dieses Defekts überwunden werden kann war fraglich. Ein Austausch des Cytidins gegen ein Thymidin an der mittleren Position in Codon 264 in *atpA* würde Edierung unnötig machen, wie dies bereits in den Suppressorlinien AG1 AG2 und AG7 bzw. L3 der Fall war (siehe Abb. 3-1, Tab. 3-1 und Tab. 3-4). Unklar in diesen Linien war jedoch, ob andere, nicht identifizierte Mutationen für die Aufhebung der Inkompatibilität (mit-)verantwortlich sind. Eine Möglichkeit zusätzliche Mutationen als Ursache auszuschließen war, das Plastidengenom in *N. tabacum* derart zu modifizieren, dass das entsprechende CTC Leucin Codon bereits auf DNA-Ebene kodiert ist und dieses Plastidengenom mit Hilfe somatischer Zellfusionierung in den Kernhintergrund von *A. belladonna* zu bringen.

Der entsprechende Transformationsvektor pCAT wurde wie bereits für pmA (siehe 3.1.3.1) und pWAT (siehe 3.1.3.2) beschrieben mit den Mutagenese-Primern CatpAfor und CatpArev hergestellt (Abb. 3-6 A). Homoplastomie wurde wie für die WAT-Mutanten mittels Restriktion eines, die Mutation überspannenden, PCR-Produkts nachgewiesen (Abb. 3-6 A, vgl. 3.1.3.2). Die erhaltenen CAT-Pflanzen unterscheiden sich nicht von der Kontrollpflanze KA (Abb. 3-6 B) oder vom *N. tabacum* Wildtyp, auch nicht unter für mA-Pflanzen kritischen Wachstumsbedingungen (vgl.: 3.1.3.1, nicht gezeigt).

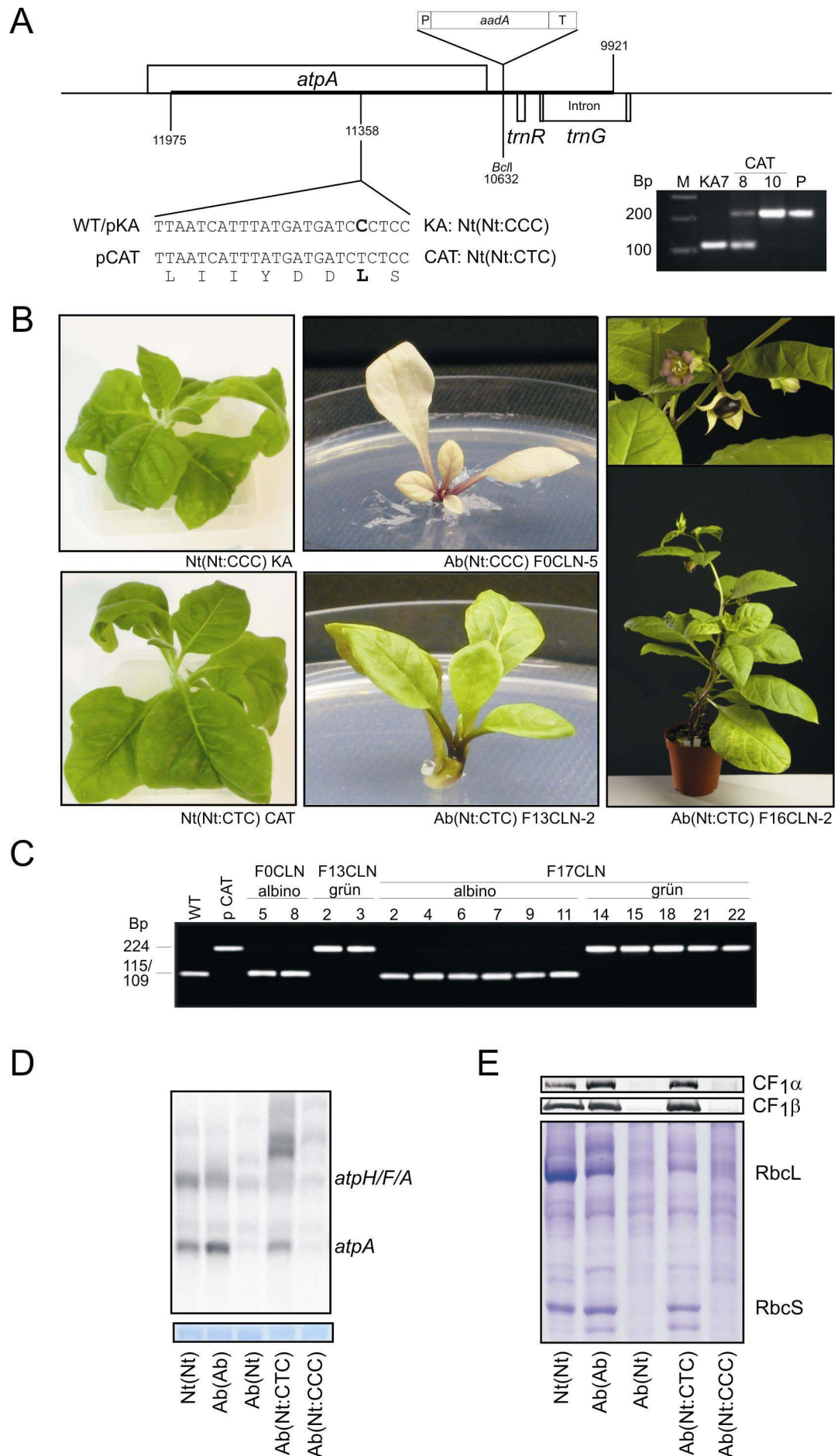


Abbildung 3-6

Abbildung 3-6: Eliminierung der Edierungsstelle in *atpA*-264

A) Genkarte und Konstruktbeschreibung wie in Abb. 3-4 beschrieben. Das *atpA*-264 Prolincodon (CCC) des Kontrollkonstruktes pKA ist im pCAT-Konstrukt durch ein Leucincodon (L, CTC) ersetzt. Die Genotypen für die Kontrollpflanze KA [Nt(Nt:CCC)] und die CAT-Mutante [Nt(Nt:CTC)] sind rechts neben dem entsprechenden Sequenzausschnitt angegeben. Homoplastomie wurde wie in Abb. 3-5 C beschrieben überprüft. CAT-8 befindet sich in einem heteroplastomischen Zustand, neben Plastidenchromosomen mit Mutation und Selektionsmarker sind auch Plastidenchromosomen des *N. tabacum* Wildtyps enthalten. **B)** Phänotyp der CAT-Mutante im Vergleich zur Kontrolllinie (KA) sowie Phänotypen der daraus hergestellten *A. belladonna* Cybriden. Links: Kontrolllinie (KA, Genotyp: [Nt(Nt:CCC)]) und CAT-Mutante (Genotyp: [Nt(Nt:CTC)]). Mitte: *A. belladonna* Cybriden mit Plastomen der jeweils links gezeigten *N. tabacum* Linie (Bezeichnungen und Genotypen: vgl. Tab. 3-5). Rechts: photoautotroph, auf Erde wachsende [Ab(Nt:CTC)]-Cybridenlinie F16CLN-2. Die albinotische Cybride mit dem Plastom der Kontrolllinie KA (Genotyp [Ab(Nt:CCC)]) ist von der ursprünglichen [Ab(Nt)]-Cybride nicht zu unterscheiden (Abb. 3-1 A), während die Cybride mit der Punktmutation in *atpA*-264 (Genotyp: [Ab(Nt:CTC)]) zu photoautotrophem Wachstum fähig ist. **C)** Restriktionsanalyse auf in den Cybriden enthaltene Plastome hinsichtlich des Codons 264 in *atpA* (vgl. Abb. 3-5 C). CCC (WT/KA) führt nach Restriktion des 224 Bp großen PCR-Produkts mit *MnII* zu zwei Fragmenten der Größe 115 und 109 Bp, CTC (CAT) führt zum Verlust der Erkennungssequenz für *MnII*. Der Phänotyp der verschiedenen Cybridenlinien korreliert mit der Kodierung in *atpA*-264 Bezeichnungen und Genotypen: vgl. Tab. 3-5; Zusammenfassung in Tab. 3-6. **D)** Northernanalyse mit *atpA*-spezifischer Einzelstrangsonde (vgl. Abb. 3-4). Während in den grünen Linien [Nt(Nt)] (*N. tabacum*), [Ab(Ab)] (*A. belladonna*) und der photoautotrophen [Ab(Nt:CTC)]-Cybride monocistronisches *atpA*-Transkript (*atpA*) in ähnlicher Weise akkumuliert, zeigt die ursprüngliche [Ab(Nt)]-Cybride wie die [Ab(Nt:CCC)]-Cybride eine deutliche Reduktion. **E)** Westernanalyse aller in D) untersuchter Linien. Sowohl die α -, als auch die β -Untereinheit der CF₁ sind in den albinotischen Linien bis unter die Detektionsgrenze reduziert. Als Ladekontrolle diente eine Coomassiefärbung; die Akkumulation verschiedener Polypeptide, wie z.B. der großen und kleinen Rubisco-Untereinheit (RbcL und RbcS) ist in den albinotischen Linien [Ab(Nt)] und [Ab(Nt:CCC)] stark reduziert.

Es bestätigte sich also, wie bereits in den Suppressorlinien angedeutet, dass der Prozess der Edierung *per se* nicht wichtig für die Funktion der Plastide ist. Allein ausschlaggebend ist die Herstellung der Kodierung für konservierte Aminosäuren auf mRNA-Ebene. Zumindest für die Edierungsstelle *atpA*-264 in *N. tabacum* kann die Information ohne Konsequenz für die Funktion des daraus resultierenden Proteins und für die Entwicklung der Pflanzen bereits auf DNA-Ebene kodiert sein.

Die Plastidengenome der transplastomischen Linie KA [Nt(Nt:CCC)] als Kontrolle und der Linie CAT [Nt(Nt:CTC)] wurden über somatische Zellfusionierung in einen *A. belladonna* Kernhintergrund gebracht. Zur Herstellung der *A. belladonna* Cybriden mit dem Plastom der CAT-Mutanten, [Ab(Nt:CTC)], wurden fünf unabhängige Fusionen durchgeführt (Tab. 3-5). Die Fusionen F13, F16, F17 und F18 erfolgten mit der Kanamycin-resistenten *A. belladonna* Linie Ab5 als Kerndonor, was die Selektion auf das nukleäre Genom von *A. belladonna* ermöglicht. Für Fusion 14 wurde als Kerndonor die Kanamycin-resistente albinotische [Ab(Nt)]-Cybride Abw3 verwendet. Selektiert wurde auf Kanamycin und grüne Regenerate mit *A. belladonna* Merkmalen. Als Plastidendonor wurden verschiedene CAT-Linien [Nt(Nt:CTC)] verwendet: die homoplastomischen Linien CAT-6 und CAT-10 für die Fusionen 14 und

16 respektive 13 und 18 und die heteroplastomische Linien CAT-8 für Fusion 17, welche sowohl mutante Plastidenchromosomen als auch wildtypspezifische Plastidenchromosomen besaß, also heteroplastomisch war ([Nt(Nt:CTC / Nt)], Abb. 3-6 A). Phänotypisch war die Linie CAT-8 aber nicht von CAT-6 oder CAT-10 zu unterscheiden (nicht gezeigt).

Die Kontrollcybriden wurden durch eine somatische Zellfusionierung von Protoplasten der Linie KA [Nt(Nt:CCC)] als Plastidendonor und der kanamycinresistenten *A. belladonna* Linie Ab5 hergestellt (Fusion 0, Tab. 3-5).

Tabelle 3-5: Cybriden mit *A. belladonna* Kerngenom und in *atpA* modifiziertem *N. tabacum* Plastom

Cybride	Fusion	Linien	Phänotyp	<i>atpA</i> -264 cCc oder cTc	Protoplastenfusion Kerngenom(Plastom)	Bezeichnung
Ab(Nt:CCC)	F0	16	albino	cCc	Nt(Nt:CCC) + Ab(Ab) ↓ Ab(Nt:CCC)	KA-7 + Ab5 ↓ F0CLN
Ab(Nt:CTC)	F16	9	grün	cTc	Nt(Nt:CTC) + Ab(Ab) ↓ Ab(Nt:CTC)	CAT-6 + Ab5 ↓ F16CLN
	F14	3	grün	cTc	Nt(Nt:CTC) + Ab(Nt) ↓ Ab(Nt:CTC)	CAT-6 + Abw3 ↓ F14CLN
	F13 F18	21	grün	cTc	Nt(Nt:CTC) + Ab(Ab) ↓ Ab(Nt:CTC)	CAT-10 + Ab5 ↓ F13CLN / F18CLN
Ab(Nt:CTC) / Ab(Nt)	F17	11/11	grün/albino	cTc/cCc	Nt(Nt:CTC/Nt) + Ab(Ab) ↓ Ab(Nt:CTC/Nt)	CAT-8 + Ab5 ↓ F17CLN

Bezeichnungen und Abkürzungen: vgl. Tab. 3-1; F0, F16, F14, F13, F18, F17: unabhängige somatische Zellhybridisierungen; Linien: Anzahl der erhaltenen unabhängigen Linien; *atpA*-264: Ab- (cTc) oder Nt-spezifische (cCc) Kodierung an Codonposition 264 in *atpA*; Linie CAT-8 ist heteroplastomisch und besitzt neben den modifizierten Plastidenchromosomen (Nt:CTC) auch Wildtyp Plastidenchromosomen (Nt), die das CCC Prolincodon besitzen; der Phänotyp korreliert mit der Kodierung in *atpA*-264

Die phänotypischen Ausprägungen bezüglich der Fähigkeit Pigmente zu akkumulieren und dadurch zu photoautotrophem Wachstum befähigt zu sein sind für alle Linien in Tab. 3-6 zusammengefasst. Alle 16 propagierten Kontrolllinien (F0) waren weiß, zwei davon (F0CLN-15 und F0CLN-18) wurden zur Analyse bezüglich des enthaltenen Plastidengenoms verwendet. Die *aadA* Kasette hat also auch im 3'-Bereich des *atpA*-Gens keinen Einfluss auf den Phänotyp der Cybriden. Aus F14 und 16, sowie 13 und 18 gingen insgesamt 33 grüne Linien hervor von denen 19 auf die enthaltenen Plastome getestet wurden. Von den aus der heteroplastomischen CAT-8-Linie entstandenen Cybridenlinien F17 wurden elf weiße und elf grüne propagiert, die alle hinsichtlich des Plastidengenoms untersucht wurden. Jeweils eine *N. tabacum* KA- und CAT-Linie, sowie Cybriden mit den entsprechenden Plastomen (Kontrolle: [Ab(Nt:CCC)]; CAT-Cybride: [Ab(Nt:CTC)]) sind in Abb. 3-6 B dargestellt.

Die Tests auf das enthaltene Plastidengenom wurden wie bereits für die das *A. belladonna* spezifische *rpoC2* Fragment enthaltenden Plastome der [Ab(Nt:AbC2)] Cybriden durchgeführt (siehe 3.1.1.2). Neben *atpA*-264 wurden für alle untersuchten Linien zusätzlich der *rpoC2*-Polymorphismus sowie die zwei Polymorphismen in *ndhA* überprüft. Für *ndhA* und *rpoC2* wurden die entsprechenden PCR-Produkte direkt sequenziert. Das PCR-Produkt zur Überprüfung von *atpA*-264 (Primer: EcoatpAfor/EcoatpArev) wurde direkt sequenziert (nicht gezeigt) und/oder mittels Restriktion auf den Basenaustausch überprüft (Abb. 3-6 C, Tab. 3-6).

Tabelle 3-6: Genotypisierung der Cybriden mit *A. belladonna* Kerngenom und in *atpA* modifiziertem *N. tabacum* Plastom

Fusion: F	Linie: CLN	Genotyp	Phänotyp	<i>atpA</i>		<i>rpoC2</i>	<i>ndhA</i>
				Res	Seq	Seq	Seq
0	15	Ab(Nt:CCC)	albino	Nt (cCc)	Nt (cCc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
	18			Nt (cCc)	Nt (cCc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
13	4	Ab(Nt:CTC)	grün		Ab (cTc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
	7				Ab (cTc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
	12N				Ab (cTc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
	13N				Ab (cTc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
	12			Ab (cTc)	Ab (cTc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
	13			Ab (cTc)	Ab (cTc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
14	1	Ab(Nt:CTC)	grün	Ab (cTc)		Nt (Ins)	Nt (95,108)
	2			Ab (cTc)		Nt (Ins)	Nt (95,108)
	3				Ab (cTc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
16	1	Ab(Nt:CTC)	grün		Ab (cTc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
	2			Ab (cTc)		Nt (Ins)	Nt (95,108)
	3				Ab (cTc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
	4				Ab (cTc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
	5				Ab (cTc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
	6			Ab (cTc)		Nt (Ins)	Nt (95,108)
	7				Ab (cTc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
	8				Ab (cTc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
	9				Ab (cTc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
	10				Ab (cTc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
17	1	Ab(Nt:CTC/CCC)	albino		Nt (cCc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
	2			Nt (cCc)		Nt (Ins)	Nt (95,108)
	3				Nt (cCc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
	4			Nt (cCc)		Nt (Ins)	Nt (95,108)
	5				Nt (cCc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
	6			Nt (cCc)		Nt (Ins)	Nt (95,108)
	7			Nt (cCc)		Nt (Ins)	Nt (95,108)
	8				Nt (cCc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
	9			Nt (cCc)		Nt (Ins)	Nt (95,108)
	10				Nt (cCc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
	11			Nt (cCc)		Nt (Ins)	Nt (95,108)
	12		grün		Ab (cTc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
	13				Ab (cTc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
	14			Ab (cTc)		Nt (Ins)	Nt (95,108)
	15			Ab (cTc)		Nt (Ins)	Nt (95,108)
	16				Ab (cTc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
	17				Ab (cTc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
	18			Ab (cTc)		Nt (Ins)	Nt (95,108)
	19				Ab (cTc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)
	20			Ab (cTc)		Nt (Ins)	Nt (95,108)
	21			Ab (cTc)		Nt (Ins)	Nt (95,108)
	22				Ab (cTc)	Nt (Ins)	Nt (95,108)

Fusion und Genotyp: vgl. Tab. 3-5; Linie: analysierte Cybridenlinie; *atpA*: Codon 264 in *atpA* ermittelt durch Restriktionsanalyse (Res) und/oder Sequenzierung (Seq); *rpoC2*: Ab- oder Nt-spezifische Deletion respektive Insertion (Ins) in *rpoC2*; *ndhA*: Ab- oder Nt-spezifische Kodierung in Codon 95 und 108 von *ndhA*; der Phänotyp korreliert mit einem cTc Leucincodon in *atpA*-264

Alle getesteten 43 Linien (13 weiße/30 grüne) enthielten ausschließlich Plastidengenome aus *N. tabacum* Linien. Die albinotischen Kontrollcybriden besitzen das Plastidengenom der KA-Linie mit dem CCC Prolin Codon und der *aadA*-Kassette im 3'-Bereich des *atpA*-Gens. Ihr Genotyp ist somit [Ab(Nt:CCC)]. Die weißen aus Fusion 17 hervorgegangenen Pflanzen besitzen das *N. tabacum* Wildtyp-Plastidengenom aus den heteroplastomischen CAT-8 Linien ohne *aadA*-Kassette (nicht gezeigt) und folglich ein CCC Prolincodon in *atpA*-264, was genotypisch der ursprünglichen [Ab(Nt)]-Cybride entspricht. Alle grünen Cybriden hingegen besitzen sowohl die *aadA*-Kassette, als auch die daran gekoppelte C-T Mutation in Codon 264 in *atpA*. Das konservierte Leucin (CTC) ist also in allen 30 getesteten photoautotroph wachsenden Cybriden bereits auf DNA-Ebene kodiert. Der Genotyp ist somit [Ab(Nt:CTC)].

Der Phänotyp korreliert also ausnahmslos mit der Kodierung in *atpA*-264: alle weißen Linien tragen das CCC Prolincodon, alle grünen Cybriden das CTC Leucin Codon. Weiter waren alle 43 getesteten Linien über mehr als 10 Regenerationszyklen stabil. Es entstand weder Panaschierung in grünen Linien noch grüne Sektoren in weißen Linien. Es kann somit für alle getesteten Linien von Homoplastomie ausgegangen werden.

Die Edierung der *N. tabacum* spezifischen Stellen wurde für die grüne [Ab(Nt:CTC)] Linie F13CLN-2 und für die weiße Kontrolllinie F0CLN-8 [Ab(Nt:CCC)] überprüft. In der albinotischen F0CLN-8 Linie verbleibt *atpA*-264 unediert, F13CLN-2 trägt das CTC Leucin Codon bereits auf DNA-Ebene. Für die vier restlichen tabakspezifischen Edierungsstellen zeigten beide Linien ähnliche Edierungseffizienzen wie in der [Ab(Nt)]-Cybride (Abb. 3-3, Tab. 3-4). Somit scheinen die beiden unedierten *ndhD* Edierungsstellen in Codon 200 und 225, sowie die partielle Edierung unter Standardbedingungen keine offensichtlichen Defekte hervorzurufen. Gleichzeitig beweisen diese Befunde, dass der Edierungsdefekt in *atpA* allein die Chlorophylldefizienz der [Ab(Nt)]-Cybriden erklären kann.

Eine Northernanalyse zeigte, dass in den Wildtypen von *N. tabacum* und *A. belladonna*, sowie in der „geretteten“ [Ab(Nt:CTC)]-Cybride (F13CLN-12) *atpA*-Transkripte in ähnlicher Weise akkumulieren, zumindest in deutlich höherem Ausmaß, als dies in den [Ab(Nt)] und [Ab(Nt:CCC)]-Cybriden der Fall ist (Abb. 3-6 D).

Nicht nur die Transkriptlevel der [Ab(Nt:CTC)]-Cybride erschienen normal, auch die Akkumulation von CF₁ α und CF₁ β war wiederhergestellt. So zeigt sich auch auf molekularer Ebene die vollständige Reversion des albinotischen Phänotyps durch die Herstellung des konservierten Codons in *atpA*-264.

Die erhaltenen grünen [Ab(Nt:CTC)]-Cybriden waren unter Standardbedingungen im Gewächshaus in ihren Wachstumsraten und phänotypischen Ausprägungen nicht vom *A. belladonna* Wildtyp zu unterscheiden (Abb. 3-6 B). In der Fertilität unterschieden sich die einzelnen Linien jedoch. Während einige Linien fertil waren und nach Selbstung normale, keimfähige Samen entwickelten waren die meisten Linien männlich steril. Diese Linien zeigten Antheren ohne sichtbaren Pollen, andere Linien zeigten völlig missgebildete Antheren. Die meisten dieser männlich sterilen Linien waren aber weiblich fertil, eine Bestäubung mit *A. belladonna* Pollen war somit möglich. Diese cytoplasmatisch-männliche Sterilität (CMS) ist für cytoplasmatische Hybriden nicht ungewöhnlich und wird vermutlich durch gestörte Interaktionen zwischen Nukleus und Mitochondrien verursacht (Nivison und Hanson 1989; Yesodi *et al.* 1997).

Für die photoautotrophen [Ab(Nt:CTC)]-Cybriden wurde nicht getestet, ob genetisches Material aus dem Nukleus von *N. tabacum* enthalten sein könnte, welches potentiell, wie in der partiellen Hybride Bar103 (siehe 3.1.2.2), zur Ergrünung führen könnte. Dagegen spricht die ausnahmslose Korrelation des Phänotyps mit der in *atpA*-264 kodierten Aminosäure in 43 Cybridenlinien. Um eine Beteiligung möglicher enthaltener *N. tabacum* Kerngenomfragmente an der Ergrünung der [Ab(Nt:CTC)]-Cybriden weiter auszuschließen, wurden fertile [Ab(Nt:CTC)]-Cybriden geselbstet. Pflanzen der F1-Generation sechs geselbsteter [Ab(Nt:CTC)]-Linien (F13CL7-2, F13CL7-3, F16CL8, F17CL17, F18CL2 und F18CL13) wuchsen ausschließlich photoautotroph und trugen das *N. tabacum* spezifische Plastom mit dem CTC Leucincodon an Position 264 in *atpA* (nicht gezeigt). Die Wahrscheinlichkeit einer Transmission von genetischem Material des *N. tabacum* Nukleus in die Folgegeneration gilt als äußerst unwahrscheinlich. Es kann also nahezu ausgeschlossen werden, dass nukleäre Chromosomenfragmente von *N. tabacum* die Restauration photoautotrophen Wachstums in den [Ab(Nt:CTC)]-Cybriden hervorgerufen haben.

Die Linien des Genotyps [Ab(Nt:CCC)] (Kontrolle) unterschieden sich von denen des Genotyps [Ab(Nt:CTC)] nur durch eine einzelne Base im Plastom. Allein diese Base entscheidet über photoautotrophes Wachstum. Im Gegensatz zum Versuch die Inkompatibilität durch Einbringen der *A. belladonna* spezifischen Deletion in *rpoC2* aufzuheben, war der Versuch dies mit der Eliminierung der Edierungsstelle zu erreichen erfolgreich. Die fehlende Edierungskapazität des Zellkerns der Tollkirche führt letztlich zu einer nicht funktionellen plastidären F_0F_1 -ATPase, was wiederum den Zusammenbruch des kompletten Photosyntheseapparates nach sich zieht. Dies ist ein weiterer Beweis für die funktionelle Relevanz plastidärer RNA Edierung. Überraschend ist, dass der Albinismus des *A. belladonna* Kerngenoms mit dem Plastom aus *N. tabacum* auf einen einzelnen Faktor, in diesem Fall RNA Edierung, zurückgeführt werden kann.

3.1.4 Edierungsdefekte an nicht artspezifischen Edierungsstellen

Der Edierungsdefekt in *atpA-264* ist die Ursache für den albinotischen Phänotyp der [Ab(Nt)]-Cybride. Auch partielle Edierung an dieser Stelle führt zu einem, wenn auch subtileren, Phänotyp in *N. tabacum*. Es wird angenommen, dass eine Koevolution durch Adaptation der Spezifitätsfaktoren an die (sich verändernden) *cis*-Elemente stattfindet. Unterscheiden sich die *cis*-Bindestellen zwischen zwei Arten, könnte es im fremden Kernhintergrund auch an Edierungsstellen, die beiden Spezies gemein sind, zu Edierungsdefekten kommen, was ebenfalls zur Inkompatibilität beitragen könnte.

Um solche Edierungsdefekte an nicht artspezifischen Edierungsstellen zu identifizieren, wurde der Edierungsstatus an allen gemeinsamen Edierungsstellen von *N. tabacum* und *A. belladonna* in [Ab(Nt)]-Cybriden und WAT-Mutanten mittels Sequenzierung bestimmt und mit vorhandenen Daten von *N. tabacum* (Sasaki, T. *et al.* 2003) und *A. belladonna* (Schmitz-Linneweber 2002) auf folgende Kriterien hin untersucht: von einem Edierungsdefekt in den [Ab(Nt)]-Cybriden wurde ausgegangen wenn sich a) die Edierungseffizienz zu der im *A. belladonna* Wildtyp unterschied und b) die verminderte Edierung nicht mit einem Rückgang edierter Transkripte in der untersuchten WAT-Mutante einherging, da Edierungseffizienzen allein aufgrund fehlender photosynthetischer Aktivität zustande kommen können. Beide Kriterien

waren nur für eine in *Arabidopsis thaliana* neu beschriebene Edierungsstelle *ndhG*-17 (Tillich *et al.* 2005) erfüllt, die auch in *N. tabacum* und *A. belladonna* ediert wird (Abb. 3-7, Tab. 3-7). Während in *N. tabacum* ausschließlich ediertes Transkript vorhanden ist, ist für die cDNA aus *A. belladonna* das C und T Signal im Chromatogramm etwa gleich stark (Abb. 3-7). Es ist also in etwa gleich viel ediertes und unediertes *ndhG*-Transkript vorhanden. In der [Ab(Nt)]-Cybride ist allerdings nur unediertes Transkript zu identifizieren, was jedoch, wie die vollständige Edierung in der untersuchten WAT-Pflanze zeigt, nicht auf die fehlende photosynthetische Aktivität des untersuchten Blattgewebes zurückzuführen ist (Abb. 3-7).

Tabelle 3-7: Editotypenvergleich

Gen	Codon in Nt	Nt ¹	SNN	Nglu	Ab ³	Ab(Nt)	WAT
<i>atpA</i>	264	cCc	+	+	+	T	-
	265	tcC	+/-	+/-	-	-	-
<i>atpF</i>	31	cCa	+	+	+	+	+
<i>ndhA</i>	114	tCa	+	+	+	+	+/-
	189	tTa	T	T	T	T	T
<i>ndhB</i>	358	tCc	+	T	T	+	+/-
	50	tCa	+	+	+/-	+	+
	156	cCa	+	+	+	+/-	+/-
	196	Cat	+	+	+	+/-	+/-
	204	tCa	+	+	+	+/-	+/-
	246	cCa	+	+	+	+	+
	249	tCt	+	+	+	+	+
	277	tCa	+	+	+	+	+
	279	tCa	+	+	+	+	+
	494	cCa	+	+	+	+	+
<i>ndhD</i>	1	aCg	+/-	+/-	+/-	-	-
	128	tCa	+	+	+	+	+/-
	200	tCa	+/-	+/-	+/-	T	+/-
	225	tCg	+	+	+	-	+/-
	293	tTa	T	+	+	T	T
<i>ndhF</i>	97	tCa	+	+/-	+/-	+	+/-
<i>ndhG</i>	17	tCg	+ ²	+	+	+/-	-
	116	tCa	+ ²	+	+	+	+/-
<i>petB</i>	204	cCa	+	+	+	+	+
<i>psbE</i>	72	Cct	+	+	+	T	+
<i>psbL</i>	1	aCg	+	+	+	+	+
<i>rpl20</i>	103	tCa	+	+	+	+/-	+
<i>rpl23</i>	24	tCt	+ ²	+	+	+	+/-
	30	tCa	+/- ²	+/-	+/-	+	+/-
<i>rpoA</i>	277	tCa	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
<i>rpoB</i>	113	tCt	+	+/-	+/-	+	+
	158	tCa	+	+/-	+/-	+/-	+
	184	tCa	+	+	+/-	+	+
	667	tCt	+	+	+	+	+
	809	tTa	T	T	T	+	T
<i>rpoC1</i>	21	tCa	+	+/-	+/-	+/-	+
<i>rpoC2</i>	1248	tCa	+	+/-	+/-	+	+/-
<i>rps2</i>	45	aCa	+	+	+	+/-	+
	83	tCa	+	+	+	+/-	+
<i>rps14</i>	27	tCa	+	+	+	+/-	+
	50	cCa	+	+	+	T	+

Nt: *Nicotiana tabacum*; SNN: *Nicotiana tabacum* var. Samsun (NN); Nglu: *Nicotiana glutinosa*; Ab: *Atropa belladonna*; Ab(Nt): Cybride mit *Atropa belladonna* Kerngenom und *Nicotiana tabacum* Plastom; WAT: albinotische *Nicotiana tabacum* WAT-Mutante; „C“ im Codon: Edierungsstelle; +: Edierung; +/-: partielle Edierung; -: keine Edierung; T: T auf DNA; ¹ (Sasaki, T. *et al.* 2003) mit Ausnahme von ²; ² diese Arbeit; ³ (Schmitz-Linneweber *et al.* 2002) und diese Arbeit

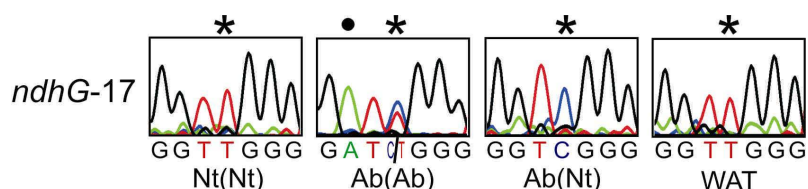


Abbildung 3-7: Edierungsdefekt in der [Ab(Nt)]-Cybride in der nicht-artspezifischen Edierungsstelle *ndhG-17*

cDNA Sequenzausschnitte der Edierungsstelle *ndhG-17* in *N. tabacum* [Nt(Nt)], *A. belladonna* [Ab(Ab)], der [Ab(Nt)]-Cybride und der WAT-Mutante. *: Edierungsstelle; •: Sequenzunterschied zwischen *N. tabacum* und *A. belladonna*. Die Edierung in *N. tabacum* [Nt(Nt)] sowie der albinotischen WAT-Mutante ist vollständig, während in *A. belladonna* eine Reduktion edierten *ndhG*-Transkripts zu erkennen ist. In der albinotischen [Ab(Nt)]-Cybride ist Edierung nicht detektierbar.

Der entsprechende Edierungsfaktor ist bereits im Wildtyp von *A. belladonna* nicht in der Lage alle Transkripte zu prozessieren. Zudem findet sich im direkten 5' Bereich der Edierungsstelle an Position -2 relativ zur Edierungsstelle *ndhG-17* eine Basensubstitution (Abb. 3-7), was potentiell die Interaktion des Spezifitätsfaktors mit der *cis*-Bindestelle weiter herabsetzen könnte und somit eine mögliche Erklärung dieses Edierungsdefektes ist.

Tabelle 3-8: Unterschiede zwischen putativen *cis*-Elementen gemeinsamer Edierungsstellen von *A. belladonna* und *N. tabacum*

Edierungsstelle	Spezies	putatives <i>cis</i> -Element
<i>atpA-265</i>	Nt	cgacacactttaatcatttatgatgatcctcCaaacaag
	Ab	cgacacactttaatcatttatgatgatcctcCaaacaag
<i>ndhA-114</i>	Nt	catagcagtaatatccatcttttctaagttattCagtaatt
	Ab	catagcagtaatatccatcttttctaagttattCagtaatt
<i>ndhA-358</i>	Nt	ttctctaggtaatctattattgacaacotcgtCccaactt
	Ab	ttctctaggtaatctattattgacaacotcgtCccaactt
<i>ndhD-1</i>	Nt	ttttatggtccaagtgtatcttgtctttactaCgaattat
	Ab	ttttatggtccaagtgtatcttgtctttactaCgaattat
<i>ndhD-128</i>	Nt	catggttagcaatgtacagtggtcaaattggatCatttttcg
	Ab	catggttagcaatgtacagtggtcaaattggatCatttttcg
<i>ndhG-17</i>	Nt	aatacatgatTTTTCTTTtagtcttttctagggtCgggtctt
	Ab	aatacatgatTTTTCTTTtagtcttttctagggtCgggtctt
<i>ndhG-116</i>	Nt	aagtctttttattttcactaattactactatttCagatacg
	Ab	aagtctttttattttcactaattactactatttCagatacg
<i>rpoB-667</i>	Nt	agtagcttatatgccgtgggaggggttacaattCtgaagat
	Ab	agtagcttatatgccgtgggaggggttacaattCtgaagat
<i>rps2-45</i>	Nt	tatttctgcaaagcgtaaggggtattcatattaCaaatctt
	Ab	tatttctgcaaagcgtaaggggtattcatattaCaaatctt
<i>rps14-27</i>	Nt	ggaacagaaatatcattcgattcgtcgatcctCaaagaaa
	Ab	ggaacagaaatatcattcgattcgtcgatcctCaaagaaa

Edierungsstelle aus dem entsprechenden Gen mit Codonposition in *Nicotiana tabacum*; Spezies: Nt: *Nicotiana tabacum*, Ab: *Atropa belladonna*; putatives *cis*-Element von -32 bis +7; C: Edierungsstelle in hellgrau hinterlegtem Codon; dunkelgrau hinterlegt: Unterschied zwischen Ab und Nt

Weitere Unterschiede im Bereich potentieller *cis*-Elemente von -32 bis +7 um homologe Edierungsstellen fanden sich für die Edierungsstellen *atpA*-265, *ndhA*-114, *ndhA*-358, *ndhD*-1, *ndhD*-128, *ndhG*-116, *rpoB*-667, *rps2*-45 und *rps14*-27 (Tab. 3-8). Für keine dieser Edierungsstellen konnte ein Edierungsdefekt identifiziert werden, der auf der Kombination des *A. belladonna* Kerngenoms mit dem *N. tabacum* Plastidengenom beruht. Entweder war für die [Ab(Nt)]-Cybride kein Unterschied zum *A. belladonna* Wildtyp zu erkennen, oder die WAT-Mutante zeigte ebenfalls reduzierte Edierung (Tab. 3-7). Im letzteren Fall handelt es sich also nicht um eine Folge von Inkompatibilität, sondern um einen sekundären Effekt des Albinismus.

3.1.5 Kreuzungsanalyse von *Nicotiana tabacum* und *Atropa belladonna* nach Eliminierung der Edierungsstelle *atpA*-264

N. tabacum und *A. belladonna* sind sexuell inkompatible Arten. Die Bestäubung von *N. tabacum* mit Pollen von *A. belladonna* führt nicht zu einer Entwicklung von Samen in den Kapseln. Ob diese sexuelle Inkompatibilität durch Eliminierung der *N. tabacum* spezifischen Edierungsstelle *atpA*-264 überwunden werden kann, sollte mit Hilfe interspezifischer Kreuzungen der *N. tabacum* CAT-Linie (♀, *atpA*-264:CTC) mit *A. belladonna* (♂) untersucht werden. In keinem der Versuche mit jeweils zwei bis fünf Pflanzen über zwei Jahre konnten Unterschiede zur Bestäubung von *N. tabacum* Wildtyp mit Pollen des *A. belladonna* Wildtyps festgestellt werden. Auch die zur Kontrolle durchgeführten reziproken Kreuzungen zeigten keinerlei Unterschied im Vergleich zu der Situation mit den entsprechenden Wildtypen. Die Eliminierung der Edierungsstelle, die einen entsprechenden kernkodierten Edierungsfaktor für die Expression der funktionsfähigen Form von CF₁α überflüssig macht, kann also die sexuelle Inkompatibilität dieser beiden Arten nicht aufheben.

3.2 Editotypenunterschiede innerhalb der Gattung *Nicotiana*

Zwischen Arten unterschiedlicher Gattungen konnte hier gezeigt werden, dass die Fluktuation plastidärer Edierungsstellen und der dazugehörigen Spezifitätsfaktoren zu einer Inkompatibilität der Kompartimente in interspezifischen Kombinationen führen kann. Die Frage, die sich hieraus ergibt ist, ob sich auch Editotypenunterschiede zwischen Arten einer Gattung finden, die eine Inkompatibilität zwischen

dem Kerngenom der einen und dem Plastidengenom der anderen Art erklären können und somit zur Abgrenzung dieser Arten voneinander beitragen können. *N. tabacum* ist bezüglich plastidärer RNA Edierung der am besten charakterisierte Organismus. Die Sequenzierung der Plastidengenome der rezenten Vertreter des mütterlichen Elters *N. sylvestris* und des väterlichen Elters *N. tomentosiformis* (Yukawa *et al.* 2006), sowie die Bestimmung und der Vergleich der jeweiligen Editotypen (Sasaki, T. *et al.* 2003) erweitern das Spektrum der Analysemöglichkeiten plastidärer RNA Edierung dieser Gattung.

Der interspezifische Vergleich von Editotypen innerhalb der Gattung *Nicotiana* mit *N. tabacum* bezüglich möglicher kompartmenteller Inkompatibilität sollte außerhalb der an der Entstehung von *N. tabacum* beteiligten Arten erfolgen. Ausgewählt wurde die diploide Art *N. glutinosa*. *N. glutinosa* besitzt wie *N. sylvestris* und *N. tomentosiformis*, einen haploiden Chromosomensatz von zwölf. Im Gegensatz zu Hybriden von *N. tabacum* mit den rezenten Vertretern seiner Vorfahren, *N. sylvestris* und *N. tomentosiformis*, waren *N. glutinosa*/*N. tabacum*-Hybriden jedoch nur nach zufälliger Verdopplung des hybriden Chromosomensatzes partiell fertil (Clausen und Goodspeed 1925, 1928). *N. glutinosa* ist der Sektion *Undulatae* zugeordnet (Knapp *et al.* 2004). Die rezenten Vertreter der Eltern von *N. tabacum* (Sektion *Nicotiana*) sind wie folgt eingeordnet: *N. sylvestris* gehört der Sektion *Sylvestres* an, während aufgrund phylogenetischer Analysen der Plastiden- und Kerngenome *N. tomentosiformis* der Sektion *Tomentosae* zugeordnet wird, die eine Schwestergruppe zum Rest der Gattung *Nicotiana* darstellt. *N. tomentosiformis* unterscheidet sich also stärker von *N. glutinosa* und *N. sylvestris*, als diese beiden Arten voneinander (Clarkson *et al.* 2004; Knapp *et al.* 2004).

Ein großer Vorteil der hier ausgewählten Art *N. glutinosa* besteht darin, dass sich mit *N. tabacum* var. Samsun (NN) (Abk. SNN) die Möglichkeit eröffnet, das Plastidengenom von *N. glutinosa* im Kernhintergrund von *N. tabacum* zu untersuchen. Bei *N. tabacum* var. SNN handelt es sich um eine alloplasmatische Linie, die durch Introgression des N-Gens aus *N. glutinosa* in *N. tabacum* entstanden ist (Clausen und Goodspeed 1925; Holmes 1938, Abb. 3-8 A).

Das N-Gen verleiht Resistenz gegen den Tabak-Mosaik-Virus (TMV). Aufgrund der Kreuzungsstrategie enthält *N. tabacum* var. SNN die Plastiden aus *N. glutinosa* im Kernhintergrund von *N. tabacum*.

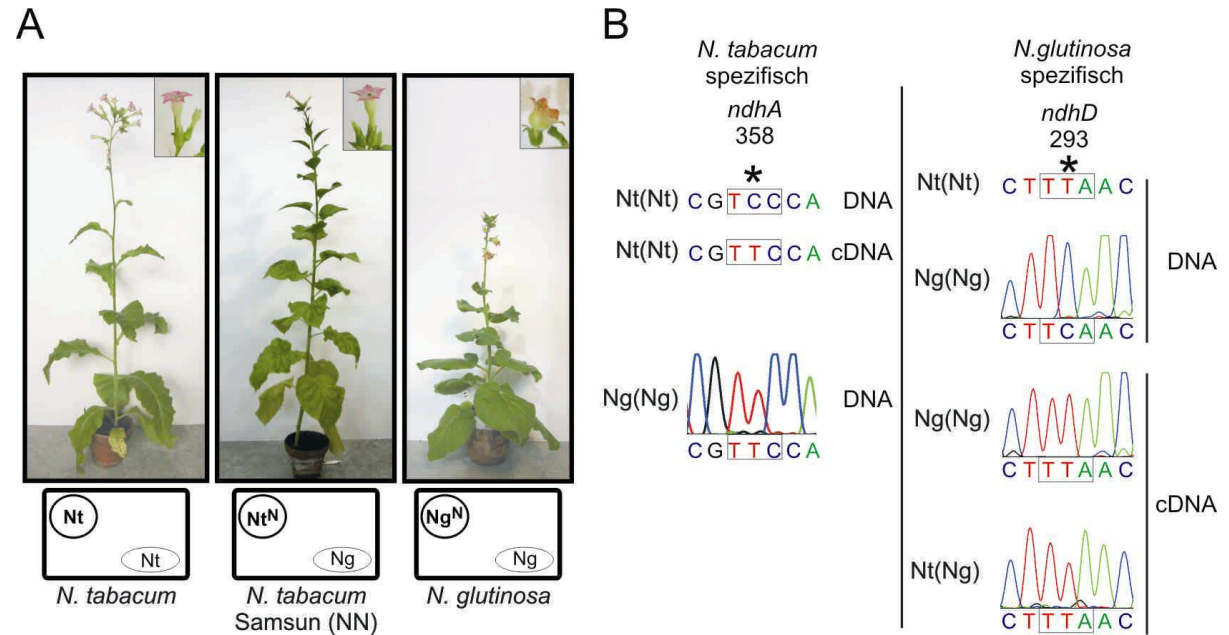


Abbildung 3-8: Heterologe Edierung der *N. glutinosa* spezifischen Edierungsstelle *ndhD*-293

A) Phänotypen von *N. tabacum* var. Petit Havanna, *N. tabacum* var. Samsun(NN) und *N. glutinosa* mit Blütenmorphologie im Bildausschnitt und Genotypen. Kreise: Nuklei; Ovale: Plastiden. Genome: Nt: *N. tabacum*; Ng: *N. glutinosa*; hochgestelltes „N“: N-Gen, verleiht Resistenz gegen Tabak-Mosaik-Virus (TMV). **B)** *N. tabacum* spezifische und *N. glutinosa* spezifische Edierungsstellen. *: Edierungsstelle im jeweiligen Codon. Links: In *N. tabacum* führt Edierung in *ndhA*-358 zur Herstellung des konservierten UUC Phenylalanincodons, das in *N. glutinosa* bereits in der DNA kodiert ist (Hirose *et al.* 1999). Rechts: In *N. glutinosa* führt Edierung in *ndhD*-293 zur Herstellung des konservierten UUA Leucincodons, das in *N. tabacum* bereits in der DNA kodiert ist. In der Kombination des *N. tabacum* Kerngenoms mit dem Plastom von *N. glutinosa* in *N. tabacum* var. Samsun (NN), [Ng(Nt)], wird die artfremde Edierungsstelle *ndhD*-293 ediert. Die Edierungsaktivität ist trotz der Abwesenheit der Edierungsstelle im Plastidengenom (T auf DNA) im *N. tabacum* Kerngenom erhalten.

3.2.1 Der Editotyp von *Nicotiana glutinosa*

Zur Bestimmung des Editotyps in Arten deren Plastidengenome vollständig sequenziert sind, orientiert man sich in der Regel am Plastidengenom des Lebermooses *Marchantia polymorpha* (Acc. Nr. X04465, Maier *et al.* 1995) für das sowohl in Mitochondrien als auch in Plastiden bisher keine Edierung beschrieben wurde (Oda *et al.* 1992; Ohyama *et al.* 1993; Ohyama 1996; Freyer *et al.* 1997; Steinhauser *et al.* 1999). Potentielle Edierungsstellen befinden sich in Codons, die durch C zu U Edierung in das in *Marchantia polymorpha* kodierte Codon überführt werden können. Ist die Aminosäure, die durch das edierte Codon kodiert ist, über mehrere Arten innerhalb der Samenpflanzen konserviert, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass das entsprechende Nukleotid ediert wird.

Für das Plastidengenom von *N. glutinosa* waren nur wenige, für phylogenetische Analysen verwendete Sequenzdaten zugänglich. Deshalb wurden zur Identifizierung

möglicher Edierungsstellen im Plastidengenom von *N. glutinosa* sämtliche Bereiche sequenziert, die bekannte Edierungsstellen in Samenpflanzen einschließen (Tab. 3-9). Diese Bereiche wurden dann bezüglich potentieller Edierungsstellen analysiert.

Tabelle 3-9: Plastidäre Edierungsstellen in sechs Spezies innerhalb der Spermatophyta

Gen	Codon in Nt	Edierungsstelle in	Gen	Codon in Nt	Edierungsstelle in
<i>accD</i>	284	At, Pt	<i>petB</i>	7	Pt
<i>atpA</i>	258	Pt		200	Pt
	264	Nt		204	Ab, Nt, Zm
	265	Nt		212	Pt
	335	Pt	<i>petD</i>	37	Pt
	345	Pt		108	Pt
	383	Os, Zm		133	Pt
<i>atpF</i>	22	Pt	<i>petG</i>	6	Pt
	31	Ab, At, Nt		27	Pt
	34	Pt	<i>petL</i>	1	Pt
	124	Pt		2	At
<i>clpP</i>	187	At		25	Pt
<i>matK</i>	219	At	<i>psaB</i>	620	Pt
	420	Zm	<i>psbB</i>	464	Pt
<i>ndhA</i>	17	Zm	<i>psbE</i>	72	At, Nt, Pt
	114	Ab, At, Nt	<i>psbF</i>	26	At
	159	Os, Zm	<i>psbL</i>	1	Ab, Nt
	189	Ab, Os, Zm		31	Pt
	358	Ab, Nt, Os, Zm	<i>rpl2</i>	1	Os, Zm
<i>ndhB</i>	50	Ab, At, Nt	<i>rpl20</i>	103	Ab, Nt, Zm
	156	Ab, At, Nt, Os, Zm	<i>rpoA</i>	277	Ab, Nt
	196	Ab, At, Nt, Os, Zm	<i>rpoB</i>	113	Ab, At, Nt
	204	Ab, Nt, Os, Zm		158	Ab, Nt, Os, Pt, Zm
	235	Os		184	Ab, At, Nt, Os, Zm
	246	Ab, Nt, Os, Zm		189	Zm, Os
	249	Ab, At, Nt		208	Zm
	277	Ab, At, Nt, Os, Zm		667	Ab, Nt
	279	Ab, At, Nt, Os, Zm		809	Ab, At
	291	At	<i>rpoC1</i>	21	Ab, Nt
	419	At	<i>rpoC2</i>	778	Zm
	494	Ab, At, Nt, Os, Zm		1248	Ab, Nt
<i>ndhD</i>	1	Ab, At, Nt	<i>rps2</i>	83	Ab, Nt
	128	Ab, At, Nt	<i>rps3</i>	54	Zm
	200	Nt	<i>rps8</i>	61	Os, Zm
	225	At, Nt	<i>rps14</i>	27	Ab, At, Nt, Os, Zm
	293	Ab, At, Os, Zm		50	At, Nt, Pt
	296	At	<i>ycf3</i>	15	Zm
<i>ndhF</i>	21	Os, Zm		62	Os, Zm
	97	Ab, At, Nt	<i>ycf5</i>	225	Pt
<i>ndhG</i>	-10*	Os, Zm		229	Pt
	116	Zm		291	Pt

Gen mit Codonposition in *Nicotiana tabacum*; *- die Angabe bezieht sich nicht auf die Codonposition, sondern das zehnte Nukleotid stromaufwärts des Startcodons von *ndhG*; Edierungsstelle in: Ab: *Atropa belladonna* (Schmitz-Linneweber et al. 2002); At: *Arabidopsis thaliana* (Tillich et al. 2005); Nt: *Nicotiana tabacum* (Hirose et al. 1999); Os: *Oryza sativa* (Corneille et al. 2000); Pt: *Pinus thunbergii* (Wakasugi et al. 1996; Sasaki, Y. et al. 2001); Zm: *Zea mays* (Maier et al. 1995; Tillich et al. 2001)

In den 16.154 sequenzierten Basen aus *N. glutinosa* wurden 70 Unterschiede in kodierenden und 11 Unterschiede in nicht-kodierenden Bereichen zu *N. tabacum* identifiziert. Nicht-kodierende Bereiche waren jedoch stark unterrepräsentiert, da für die Identifizierung von Edierungsstellen nur kodierende Bereiche von Interesse waren. 31 Unterschiede in kodierenden Regionen führen zu einer veränderten Kodierung, die in 5 Fällen auf einer C zu T oder T zu C Transition beruhen und somit durch Edierung auf mRNA-Ebene bereinigt werden könnten. Zwei dieser C-T

Transitionen befinden sich an bereits aus anderen Arten bekannten Edierungsstellen: *ndhA*-358 und *ndhD*-293.

Zur Bestimmung der Edierungsstellen in *N. glutinosa* wurde Gesamt-RNA aus vier bis sechs Wochen alten, auf Erde gewachsenen *N. glutinosa* Pflanzen revers transkribiert, mittels PCR die entsprechenden Bereiche amplifiziert, sequenziert und mit den DNA-Sequenzen verglichen. Alle in *N. glutinosa* identifizierten Edierungsstellen sind in Tab. 3-7 zusammengefasst. Der Editotyp von *N. glutinosa* entspricht dem von *N. tabacum* (Hirose *et al.* 1999; Sasaki, T. *et al.* 2003) mit Ausnahme der bereits erwähnten Edierungsstellen *ndhA*-358 und *ndhD*-293. Das TTC Codon 358 in *ndhA* in *N. glutinosa* kodiert für das an dieser Position konservierte Phenylalanin, während auf DNA-Ebene in *N. tabacum* ein TCC Serin Codon kodiert ist, welches durch Edierung in ein Phenylalanin-Codon überführt wird (Hirose *et al.* 1999). Für *ndhD*-293 hingegen findet sich auf DNA-Ebene von *N. glutinosa* ein TCA Serin-Codon während in *N. tabacum* ein TTT Leucin-Codon beschrieben ist (Acc. Nr. Z00044, Abb. 3-8 B, Tab. 3-7). Das Cytidin in *ndhD*-293 wird in *N. glutinosa* ediert. Die Sequenzunterschiede in der DNA in *ndhA*-358 und *ndhD*-293 werden somit jeweils in einer der beiden *Nicotiana* Spezies mittels RNA Edierung auf mRNA-Ebene bereinigt (Abb. 3-8 B). Die restlichen drei identifizierten Unterschiede, welche durch C-U Edierung in das in der jeweils anderen Art auf DNA-Ebene kodierte Codon überführt werden könnten, zeigten sich jedoch in der jeweiligen Art, die ein C auf DNA-Ebene besitzt nicht ediert. Für *N. glutinosa* ist dies Codon 203 in *rpoB* (ACT) sowie für *N. tabacum* die Codons 91 in *ndhG* (CAT) und 803 in *rpoB* (ACG).

Zusätzlich zu der bereits für *N. tabacum* und *A. belladonna* neu beschriebenen Edierungsstelle in *ndhG*-17 konnten drei weitere neue Edierungsstellen in *ndhG*-116 (uCa), *rpl23*-24 (uCu) und *rpl23*-30 (uCa) für *N. glutinosa* identifiziert werden (Abb. 3-9). Für diese neuen Stellen konnte auch in *N. tabacum*, sowie *N. sylvestris* und *N. tomentosiformis* Edierung nachgewiesen werden (Tab. 3-7, nicht gezeigt). Damit sind für *N. tabacum* mittlerweile 38 Edierungsstellen identifiziert. Drei dieser vier neuen Edierungsstellen für *Nicotiana*, *ndhG*-17, *ndhG*-116 und *rpl23*-30, passen nicht in das herkömmliche Raster von Edierungsstellen, da durch Edierung nicht das entsprechende in *M. polymorpha* kodierte Codon hergestellt wird, sondern sich die jeweilige Kodierung nach Edierung von *M. polymorpha* unterscheidet.

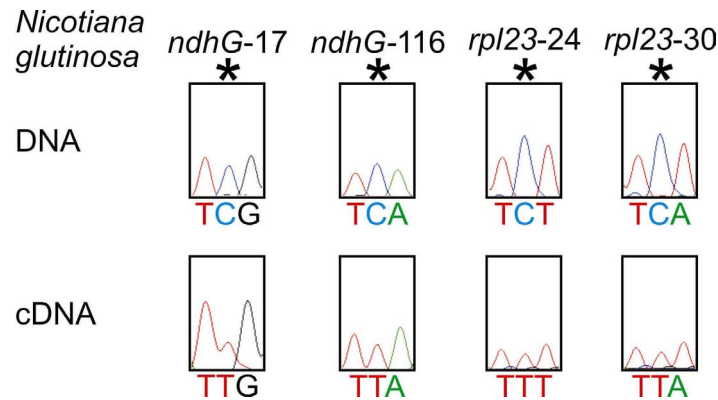


Abbildung 3-9: Neu identifizierte Edierungsstellen in *N. glutinosa*

Repräsentative DNA- und cDNA Sequenzausschnitte aus *N. glutinosa* für die in Solanaceen neu identifizierten Edierungsstellen *ndhG-17*, *ndhG-116*, *rpl23-24* und *rpl23-30* (vgl. Tab. 3-7).

3.2.2 Heterologe Edierung nicht homologer Edierungsstellen

Die Editotypenunterschiede zwischen *N. glutinosa* mit *N. tabacum* in *ndhA-358* und *ndhD-293* könnten zu einer Inkompatibilität von Kern- und Plastidengenom beitragen, da sie jeweils in einer Art ediert werden, in der anderen aber bereits auf DNA-Ebene für die konservierte Aminosäure kodieren. Das Kerngenom von *N. glutinosa* könnte bezüglich der Edierungsstelle in *ndhA-358* mit dem Plastidengenom von *N. tabacum* inkompatibel sein, falls – wie es dem bisherigen Modell von plastidärer Edierung entspricht – der Spezifitätsfaktor nicht (mehr) funktionell im Kerngenom von *N. glutinosa* kodiert ist. Für *ndhD-293* stellt sich die Situation bezüglich der Arten umgekehrt dar. Um kompatibel mit dem Plastidengenom von *N. glutinosa* zu sein, müsste *N. tabacum* den Spezifitätsfaktor für diese Edierungsstelle bereitstellen.

Die Tabakvarietät *N. tabacum* var. Samsun (NN) bietet die Möglichkeit die *N. glutinosa* spezifische Edierungsstelle *ndhD-293* im fremden Kernhintergrund zu untersuchen. Direkt sequenzierte, die Edierungsstelle überspannende cDNA-PCR-Produkte zeigten, dass die Edierungsstelle *ndhD-293* im fremden Kernhintergrund von *N. tabacum* ediert wird (Abb. 3-8 B). Der Edierungsfaktor scheint aber nicht an das eingekreuzte N-Gen aus *N. glutinosa* gekoppelt zu sein. Die photoautotroph wachsende [Nt(Ab)]-Cybride (Kushnir *et al.* 1986; Kushnir *et al.* 1987) besitzt ein reinerbiges *N. tabacum* Kerngenom ohne N-Gen und ist ebenfalls in der Lage *ndhD-293* zu edieren (Tillich *et al.* 2006b). Die Edierungsstelle wird sowohl in sexuell als auch somatisch erzeugten alloplasmatischen Pflanzenlinien ediert. Der Nukleus von *N. tabacum* besitzt also die Edierungskapazität für die artfremde Edierungsstelle

ndhD-293. Somit zeigt er sich hinsichtlich plastidärer RNA Edierung kompatibel mit der artfremden Plastide aus *N. glutinosa*.

Heterologes Edieren wurde zum ersten Mal in *N. tabacum* für die aus Spinat eingebrachte Edierungsstelle in *ndhA*-189 beschrieben (Schmitz-Linneweber *et al.* 2001). Frühere Versuche deuteten darauf hin, dass Edierungsstelle und Spezifitätsfaktor evolutionär gekoppelt sind und somit für heterolog eingebrachte Edierungsstellen der/die entsprechende(n) Faktor(en) nicht zur Verfügung stehen (Bock *et al.* 1994; Reed und Hanson 1997).

Die Ergebnisse dieser und weiterer Arbeiten zeigten, dass vier von bisher zehn in fremdem Kernhintergrund getesteten Edierungsstellen heterolog ediert werden (Tab. 3-10, publiziert in Tillich *et al.* 2006b). Eine Edierungsaktivität ist also trotz der Abwesenheit der Edierungsstelle (T auf DNA) in fast der Hälfte aller bisher untersuchten Fälle vorhanden. Somit handelt es sich bei heterologer Edierung nicht um eine Ausnahme. Offensichtlich sind die benötigten Faktoren in vielen Fällen evolutionär stabiler als zunächst angenommen worden war.

Die bezüglich heterologer Edierung untersuchten Edierungsstellen wurden mit bereits vorhandenen Daten aus verschiedenen Arten innerhalb der Spermatophyta verglichen (Tab. 3-10). Fehlende Daten zur Edierung der jeweiligen Stellen in verschiedenen Spezies wurden durch Sequenzierung der aus Gesamt-RNA erhaltenen, mittels PCR amplifizierten cDNA ergänzt (Tab. 3-10). Den heterolog edierten Stellen ist gemein, dass sie weit verbreitet innerhalb der Spermatophyta sind, während die nicht heterolog edierten Stellen auf wenige Arten beschränkt sind (Tab. 3-10). Ist eine Edierungsstelle (C-U Edierung auf RNA-Ebene) also phylogenetisch weit verbreitet, scheint der entsprechende Edierungsfaktor evolutionär stabil zu sein. Edierungsfaktoren können also entsprechend ihrer evolutionären Stabilität klassifiziert werden.

Die evolutionäre Stabilität bestimmter Edierungsfaktoren könnte durch eine zusätzliche Funktion erklärt werden, wie bereits früher vermutet worden war (Covello und Gray 1993). Über die Natur dieser weiteren Funktion, kann jedoch nur spekuliert werden, da Spezifitätsfaktoren für das Edierungssystem in Plastiden höherer Pflanzen mit einer Ausnahme noch nicht identifiziert werden konnten (Kotera *et al.* 2005).

Tabelle 3-10: Heterologe Edierung und phylogenetische Verbreitung getesteter Edierungsstellen innerhalb der Spermatophyta

		Angiospermae								Gymnospermae	
		Dicotyledoneae							Monocotyledoneae		
		<i>N. tab.</i>	<i>N. syl.</i>	<i>N. glu.</i>	<i>N. tom.</i>	<i>A. bel.</i>	<i>P. sat.</i>	<i>S. ole.</i>	<i>Z. may.</i>	<i>O. sat.</i>	<i>P. thu.</i>
heterolog	<i>ndhA</i>	L189 ¹	L189 ²	L189 ³	S189L ¹	S189L ⁴	L189 ⁵	S191L ¹	S188L ⁶	S188L ⁷	–8
	<i>ndhD</i>	L293 ^{9,10}	L293 ¹¹	S293L ⁹	S293L ¹⁰	S293L ⁴	S293L ³	S293L ⁶	S293L ⁷	S293L ⁷	–8
	<i>psbE</i>	P72S ¹²	P72S ¹³	P72S ¹⁸	P72S ¹³	S72 ¹⁰	S72 ⁵	S72 ¹⁴	S72 ¹⁵	S72 ¹⁶	P72S ¹⁷
	<i>rps14</i>	P50L ¹²	P50L ¹³	P50L ¹⁸	P50L ¹³	L50 ¹⁰	L50 ⁵	P50L ³	L53 ¹⁵	L53 ¹⁶	S49L ¹⁷
nicht heterolog	<i>atpA</i>	P264L ¹²	P264L ¹³	P264L ¹⁸	P264L ¹³	L264 ¹⁰	L264 ⁵	L264 ¹⁴	L264 ¹⁵	L264 ¹⁶	L264 ⁸
	<i>ndhD</i>	S200L ¹²	S200L ¹³	S200L ¹⁸	S200L ¹³	L200 ¹⁰	L200 ⁵	L200 ¹⁴	L200 ¹⁵	L200 ¹⁶	–8
	<i>ndhD</i>	S225L ¹²	S225L ¹³	S225L ¹⁸	S225L ¹³	L225 ¹⁰	S225L ⁵	L225 ¹⁴	L225 ¹⁵	L225 ¹⁶	–8
	<i>psbF</i>	F26 ¹⁹	F26 ¹¹	F26 ³	F26 ²⁰	F26 ²¹	S26F ⁵	S26F ¹⁹	F26 ¹⁵	F26 ¹⁶	F26 ⁸
	<i>rpoB</i>	L208 ²²	L208 ¹¹	L208 ³	L208 ²⁰	L208 ²¹	L208 ⁵	L208 ¹⁴	P206L ⁶	P206 ⁷	L209 ⁸
	<i>rpoB</i>	L809 ¹⁰	L809 ¹¹	L809 ³	L809 ²⁰	S809L ⁴	nb	S809 ³	L814 ¹⁵	L814 ¹⁶	S814L ²³
nb	<i>ndhA</i>	S358F ¹²	S358F ¹³	L358 ⁹	S358F ¹³	S358F ⁴	S358 ⁵	S360F ³	S357F ⁶	S357F ⁷	–8

Heterolog edierte Edierungsstellen: *ndhA*-189 (Codon in *Nicotiana tabacum*), *ndhD*-293, *psbE*-72, *rps14*-50, weite phylogenetische Verbreitung; nicht heterolog edierte Edierungsstellen: *atpA*-264, *ndhD*-200, *ndhD*-225, *psbF*-26, *rpoB*-208, *rpoB*-809, phylogenetisch eingeschränkte Verbreitung und/oder Edierung nicht essentiell; weite phylogenetische Verbreitung der nicht auf heterologe Edierung getesteten Edierungsstelle *ndhA*-358, die im Vergleich zwischen *Nicotiana tabacum* und *Nicotiana glutinosa* spezifisch für *Nicotiana tabacum* ist; *N. tab.*: *Nicotiana tabacum*; *N. syl.*: *Nicotiana sylvestris*; *N. glu.*: *Nicotiana glutinosa*; *N. tom.*: *Nicotiana tomentosiformis*; *A. bel.*: *Atropa belladonna*; *P. sat.*: *Pisum sativum*; *S. ole.*: *Spinacia oleracea*; *Z. may.*: *Zea mays*; *O. sat.*: *Oryza sativa*; *P. thu.*: *Pinus thunbergii*; angegeben ist die jeweilige, auf DNA kodierte Aminosäure und gegebenenfalls die nach Edierung kodierte Aminosäure an der entsprechenden Codonposition des jeweiligen Organismus; grün: konserviertes Codon (T auf DNA), heterologe Edierung nicht endogener Edierungsstelle (C-U auf mRNA) im Kernhintergrund der angegebenen Art; hellgrau: konserviertes Codon (T auf DNA), heterologe Edierung in der jeweiligen Art nicht getestet; dunkelgrau: endogene Edierungsstelle wird ediert (C-U auf mRNA); rot: konserviertes Codon (T auf DNA), keine heterologe Edierung (C auf mRNA); schwarz: endogene Edierungsstelle wird nicht ediert (C in mRNA); nb: nicht bestimmt; -: Gen nicht vorhanden; ¹ (Schmitz-Linneweber *et al.* 2001); ² (Tillich *et al.* 2006b); ³ diese Arbeit, nicht gezeigt; ⁴ (Schmitz-Linneweber *et al.* 2002); ⁵ (Inada *et al.* 2004); ⁶ (Maier *et al.* 1995; Tillich *et al.* 2001); ⁷ (Corneille *et al.* 2000); ⁸ Acc. Nr.: D17510; ⁹ Abb. 3-8; ¹⁰ (Tillich *et al.* 2006b); ¹¹ Acc. Nr.: AB237912; ¹² (Hirose *et al.* 1999); ¹³ (Sasaki, T. *et al.* 2003); ¹⁴ Acc. Nr.: AJ400848; ¹⁵ Acc. Nr.: X86563; ¹⁶ Acc. Nr.: X15901; ¹⁷ (Wakasugi *et al.* 1996); ¹⁸ Tab. 3-7; ¹⁹ (Bock *et al.* 1994); ²⁰ Acc. Nr.: AB240139; ²¹ Acc. Nr.: AJ316582; ²² (Reed und Hanson 1997); ²³ *Pinus sylvestris*, diese Arbeit, nicht gezeigt

In neueren Untersuchungen wurden Edierungsstellen in Gruppen eingeteilt, die möglicherweise vom selben Spezifitätsfaktor erkannt werden (Chateigner-Boutin und Hanson 2002, 2003; Tillich *et al.* 2005). Der Selektionsdruck auf den Erhalt des Faktors könnte somit die Edierung einer anderen Edierungsstelle sein. Der Spezifitätsfaktor, der die Edierung der heterologen Edierungsstelle *ndhD*-293 vermittelt, müsste somit auch für die Erkennung einer weiteren Edierungsstelle verantwortlich sein. Hierzu wurde das Plastidengenom von *Nicotiana tabacum* (Acc. Nr. Z00044) auf Homologien zum Bereich -32 bis +7 um die Edierungsstelle *ndhD*-293 (= 0) überprüft. Dieser Bereich sollte nach jetzigem Kenntnisstand das für die Spezifitätsfaktorbindung essentielle *cis*-Element einschließen. Da die Sequenzhomologien der *cis*-Elemente sehr schwach sind und bisher kein einheitliches Motiv identifiziert werden konnte wurde für die Suche die Software „Pattern Hunter 2.0“ (Bioinformatics Solutions Inc.; Waterloo, ON, Canada; <http://www.bioinformaticsolutions.com/products/ph/>) eingesetzt, die im Vergleich zu BLAST sensibler und

schneller ist. Die wenig stringent gewählten Parameter (-s 2 -G 1 -E 1 -r 2 -q -1 -e 100000 -N 1000 -Ns 1000 -multi 16) lieferten 30 Treffer, wovon keiner eine bereits bekannte Edierungsstelle aus Samenpflanzen betraf. Vier dieser Treffer befanden sich in Leserichtung proteinkodierender Bereiche bekannter Gene und hatten an der Nukleotidposition 0 bzw. +/-1 ein Cytidin, welches als potentielles Ziel für Edierung betrachtet wurde. Diese Treffer sind *ndhB*-125 (Gct, Grossbuchstabe = Position 0), *psbH*-5 (aCt), *orf99*-29 (Ctt) und *ycf4*-55 (Cag). Eine Überprüfung der cDNA aus *N. tabacum* Gesamt-RNA ergab, dass keine dieser Stellen ediert wird (nicht gezeigt). Auch eine nach den gleichen Kriterien identifizierte Position im Mitochondriengenom von *N. tabacum* (Acc. Nr. AP006341, *orf102a*-46) zeigte keine Edierung (nicht gezeigt). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der spezifische Edierungsfaktor für die Edierungsstelle in *ndhD*-293 zusätzlich in die Prozessierung einer weiteren Edierungsstelle involviert ist, die vorliegenden Ergebnisse geben jedoch keinen Hinweis darauf.

Für die Edierungsstelle in *ndhA*-358 müsste das Plastidengenom von *N. tabacum* im Kernhintergrund von *N. glutinosa* überprüft werden. Dafür sind keine alloplasmatischen *Nicotiana* Linien verfügbar. Für die Edierungsstelle *ndhA*-358 würde die Kreuzung *N. tabacum* ♀ x *N. glutinosa* ♂ (hybrider Genotyp [NtNg(Nt)]) die Edierungsstelle in den hybriden Kernhintergrund aus *N. tabacum* und *N. glutinosa* bringen (Abb. 3-10). Durch Rückkreuzungen mit *N. glutinosa* könnte genetisches Material von *N. tabacum* sukzessive eliminiert werden. Die durchgeführten Kreuzungen von *N. tabacum* var. Petit Havanna ♀ x *N. glutinosa* ♂ waren im Gegensatz zu früheren, für andere *N. tabacum* Varietäten beschriebenen Ergebnissen äußerst vielversprechend (Clausen und Goodspeed 1925). Die Samenkapseln der mit *N. glutinosa* bestäubten *N. tabacum* Blüten entwickelten sich vergleichbar zu geselbsteten *N. tabacum* Blüten. Die F1-Generation war in ihrer Wuchsform einschließlich der Blütenmorphologie *N. tabacum* sehr ähnlich (Abb. 3-10), aber selbststeril und nicht rückkreuzbar mit *N. glutinosa*. Somit konnte die entsprechende Edierungsstelle nicht in der F2-Generation auf Edierungsdefekte untersucht werden. Die hybriden F1-Pflanzen wiesen keine Reduktion der Edierungseffizienz in *ndhA*-358 auf (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis ist aufgrund der erwarteten Kerngenomzusammensetzung mit dem vollständigen Chromosomensatz von *N. tabacum* und der angenommenen rezessiven Ausprägung für Spezifitätsfaktoren nicht überraschend und erlaubt

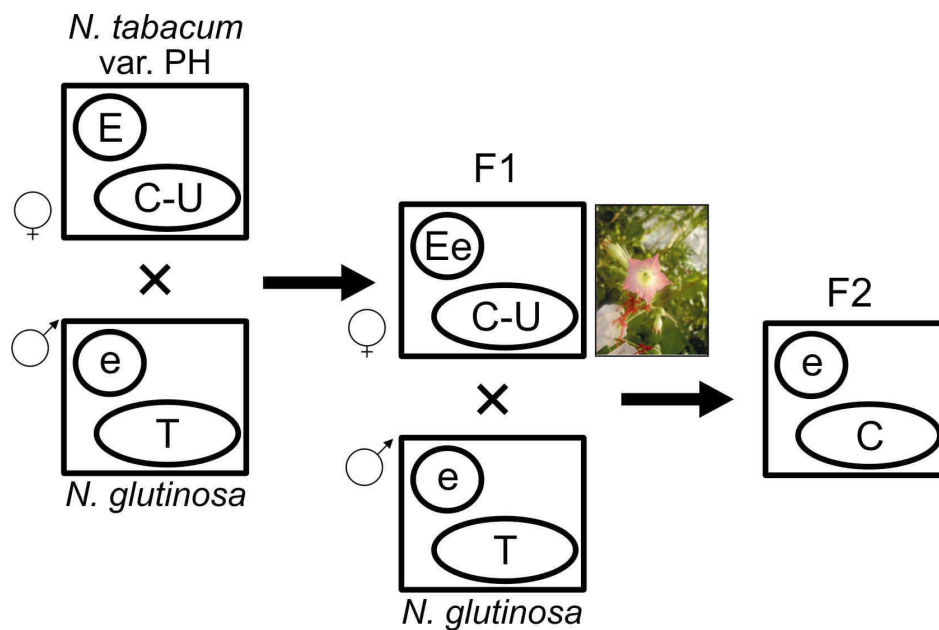


Abbildung 3-10: Kreuzungsschema zur Introgression einer *N. tabacum* spezifischen Edierungsstelle in den Kernhintergrund von *N. glutinosa*

Kreuzungsschema mit uniparentaler, maternaler Plastidenvererbung. Im *N. tabacum* Kerngenom ist für die Edierung einer Edierungsstelle (C-U) ein funktionelles Allel für den Spezifitätsfaktor (E) vorhanden. Als Folge eines nicht-funktionellen Allels des Spezifitätsfaktors (e) in *N. glutinosa*, aufgrund der Abwesenheit der Edierungsstelle (T), könnten Teile der F2-Generation Edierungsdefekte aufweisen (C). Kreise: Nuklei; Ovale: Plastiden; Bild: Blüte einer Hybride in der F1 Generation.

keinerlei Aussage über eine eventuelle heterologe Edierung der *N. tabacum* spezifischen Stelle durch *N. glutinosa*.

Als zweite Möglichkeit wurde getestet, ob die Edierungsstelle *ndhA-358* mittels Plastidentransformation in das Plastidengenom von *N. glutinosa* eingebracht werden könnte. Voraussetzung hierfür wäre zum einen Sensitivität gegen Spektinomycin, um eine Selektion auf rekombinante Plastidenchromosomen zu gewährleisten, und zum anderen wäre es die Fähigkeit der *in vitro* Regeneration von *N. glutinosa*. Das Ausbleichen der Blattstücke von *N. glutinosa* auf Selektivmedium zeigte, dass die organelläre Translation bereits ab einer Spektinomycinkonzentration von 300 µg/ml gehemmt zu sein scheint. Somit wäre eine Selektion auf den Resistenzmarker *aadA* möglich. Allerdings konnte auf nicht-selektivem RMOP-Medium selbst durch die Verdopplung der Hormonkonzentration auf 2 mg/l BAP und 0,2 mg/l NAA über einen Zeitraum von sechs Monaten kein Sprosswachstum aus dem entstandenen Kallusgewebe induziert werden.

Es gibt also keinen experimentellen Beweis für oder gegen heterologe Edierung der *N. tabacum* spezifischen Edierungsstelle *ndhA-358* im *N. glutinosa* Kernhintergrund. Hinweise darauf ergeben sich lediglich durch die theoretische Betrachtung

verfügbarer Daten zu dieser Edierungsstelle. Die Edierungsstelle *ndhA*-358 besitzt Ähnlichkeiten zu der synonymen Edierungsstelle (Edierung an der dritten Position im Codon) *atpA*-265 (Chateigner-Boutin und Hanson 2003). Das bedeutet, dass möglicherweise ein Spezifitätsfaktor für die Edierung beider Stellen zuständig ist. In *N. glutinosa* verbleibt die Edierungsstelle *atpA*-265 unediert. Nur in *N. tabacum* var. BY4 und *N. tabacum* var. SNN findet Edierung statt (Tab. 3-7). Die Edierungsaktivität für *atpA*-265 scheint somit spezifisch für *N. tabacum* zu sein. Im Falle der Koedierung der Stellen *atpA*-265 und *ndhA*-358 wäre eine im Kerngenom von *N. glutinosa* kodierte Edierungsaktivität also unwahrscheinlich. Ordnet man hingegen *ndhA*-358 in die Tabelle mit bisher auf heterologe Edierung untersuchten Edierungsstellen ein (Tab. 3-10), so ist die weite phylogenetische Verbreitung dieser Edierungsstelle zu erkennen. Falls also tatsächlich die phylogenetische Verbreitung von Edierungsstellen mit der Stabilität der jeweiligen Spezifitätsfaktoren korreliert, könnte für die Edierungsstelle *ndhA*-358 erwartet werden, dass *N. glutinosa* den Spezifitätsfaktor besitzt und somit in der Lage ist sie zu edieren. Da für *N. glutinosa* bisher jedoch keinerlei Daten bezüglich der Fähigkeit heterologer Edierung erhoben sind, ist diese Betrachtung rein spekulativ.

3.2.3 Unterschiedliche Edierungseffizienz an nicht-speziesspezifischen Edierungsstellen

Wie die Analyse der transplastomischen mA-Linie gezeigt hat, könnte auch partielle Edierung zu einer Unverträglichkeit von Kerngenom und Plastom beitragen, da dies ebenfalls zu einer Reduktion der Fitness führen kann. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zu den nicht homologen Edierungsstellen alle in *N. glutinosa* identifizierten Edierungsstellen bezüglich Edierungseffizienz in *N. tabacum* var. SNN, also im Kernhintergrund von *N. tabacum*, verglichen (Tab. 3-7). Unterschiede, die auf eine Inkompatibilität des Kerns aus *N. tabacum* mit der Plastide aus *N. glutinosa* hindeuten würden, konnten nicht identifiziert werden. An den Edierungsstellen *ndhB*-50 und *rpoB*-184 wurde im fremden Kernhintergrund ([Nt(Ng)], SNN) sogar eine erhöhte Effizienz im Vergleich zu *N. glutinosa* festgestellt. Anstatt partiell zeigten sich diese Positionen voll ediert. Ebenfalls erhöht war die Edierungseffizienz für die synonyme Edierungsstelle *atpA*-265. Während diese Stelle in *N. glutinosa* nicht ediert wird, wird sie im fremden Kernhintergrund in *N. tabacum* var. SNN wie in

N. tabacum partiell ediert. Der Spezifitätsfaktor für diese Edierungsstelle scheint somit *N. tabacum* spezifisch zu sein. Eine Auswirkung auf die Kompatibilität des Kerngenoms von *N. glutinosa* mit dem Plastidengenom von *N. tabacum* ist aber aufgrund der betroffenen synonymen dritten Position im Codon nicht zu erwarten. Die Edierungsstellen *ndhF*-97, *rpoB*-113, *rpoB*-158, *rpoC1*-21 und *rpoC2*-1248 waren sowohl in *N. glutinosa*, als auch in SNN partiell ediert und unterschieden sich so nur von der Situation in *N. tabacum*. Dort sind diese Stellen als voll ediert beschrieben (Tab. 3-7). Ein Grund für die beobachteten Unterschiede der Edierungseffizienz könnten Unterschiede in den *cis*-Elementen der Edierungsstellen sein. Der einzige Unterschied innerhalb eines putativen *cis*-Elements betroffener Edierungsstellen wurde für die Edierungsstelle *rpoC1*-21 an Nukleotidposition -11 (Edierungsstelle = 0) gefunden (Tab. 3-11). Weitere Unterschiede in *cis*-Elementen von Edierungsstellen beider Arten (*N. tabacum* und *N. glutinosa*) in *ndhG*-17 (-2 = Sequenzunterschied), *rps2*-45 (-29) und *rps2*-83 (-14) (Tab. 3-11) schlugen sich nicht auf die Edierungseffizienz in der Genomkombination [Nt(Ng)] (SNN) nieder.

Tabelle 3-11: Unterschiede zwischen putativen *cis*-Elementen gemeinsamer Edierungsstellen von *N. tabacum* und *N. glutinosa*

Edierungsstelle	Spezies	putatives <i>cis</i> -Element
<i>ndhG</i> -17	Nt	aatacatgattttcttttagtctttctagggtCgggtctt
	Ng	aatacatgattttcttttagtctttctagggtCgggtctt
<i>rpoC1</i> -21	Nt	tcgatataaacatcaacagcttcgaattggatCagtttct
	Ng	tcgatataaacatcaacagcttcgaattggatCagtttct
<i>rps2</i> -45	Nt	tatttctgcaaagcgtaagggtattcatattaCaaatctt
	Ng	tatttctgcaaagcgtaagggtattcatattaCaaatctt
<i>rps2</i> -83	Nt	aattggttggtacccaaaaaacaagcagctgattCagtagag
	Ng	aattggttggtacccaaaaaacaagcagctgattCagtagag

Edierungsstelle aus dem entsprechenden Gen mit Codonposition in *Nicotiana tabacum*; Spezies: Nt: *Nicotiana tabacum*, Ng: *Nicotiana glutinosa*; putatives *cis*-Element von -32 bis +7; C: Edierungsstelle in hellgrau hinterlegtem Codon; dunkelgrau hinterlegt: Unterschied zwischen Nt und Ng

Interspezifische Unterschiede in der Effizienz von Edierung bzw. Unterschiede in *cis*-Elementen scheinen also keinen Einfluss auf die Kompatibilität des Kerngenoms von *N. tabacum* mit dem Plastidengenom von *N. glutinosa* zu haben.

4. Diskussion

Die Cybride mit dem Kerngenom von *Atropa belladonna* und dem Plastom von *Nicotiana tabacum*, [Ab(Nt)], zeigt einen albinotischen Phänotyp (Kushnir *et al.* 1991). Dieser Phänotyp ist nicht Folge von nukleären oder plastidären Mutationen, sondern das Resultat einer gestörten Interaktion zwischen den artfremden Genomen dieser Kompartimente.

4.1 Der albinotische Phänotyp der [Ab(Nt)]-Cybriden beruht nicht auf mitochondriellen Defekten

Neben der hier untersuchten Interaktion zwischen Kerngenom und Plastom spielt in der pflanzlichen Zelle auch das mitochondrielle Genom (Chondriom) und dessen Einbindung in das genetische Gesamtsystem eine essentielle Rolle. Welche Auswirkung potentielle mitochondrielle Defekte in Cybriden auf beobachtete Phänotypen haben, ist dabei schwer zu beurteilen.

Sowohl Mais NCS-Mutanten (non-chromosomal stripe) als auch *Arabidopsis* CHM-Mutanten (chloroplast mutator) zeigen Variegation. Dieser Phänotyp wurde in beiden Fällen auf Rearrangements mitochondrieller DNA zurückgeführt (Newton und Coe 1986; Martinez-Zapater *et al.* 1992). Mitochondrielle Defekte können also Einfluss auf die Plastidenentwicklung haben. Für somatische Zellhybridisierungen ist beschrieben, dass sich Mitochondriengenome von denen der Ausgangsarten unterscheiden, was das Resultat von Rekombinationsereignissen während der Cybridisierung ist (Belliard *et al.* 1979). Es wäre somit möglich, dass die gestörte Chloroplastendifferenzierung der [Ab(Nt)]-Cybriden auch auf Rearrangements im Mitochondriengenom zurückzuführen ist.

Interessanterweise zeigen Cybriden mit dem Kerngenom aus *N. tabacum* und dem Plastidengenom aus *Petunia hybrida* Variegation. Dieser Phänotyp wurde in der Tat der somatischen Segregation von mutanter und „normaler“ mitochondrieller DNA zugeschrieben (Bonnett *et al.* 1993). Aus hellen Blattsektoren konnten jedoch keine rein albinotischen Pflanzen regeneriert werden. Höchstwahrscheinlich ist der mitochondrielle Defekt letal.

Bei der Herstellung der [Ab(Nt)]-Cybriden wurden 29 unabhängige albinotische Linien isoliert (Kushnir *et al.* 1991). Alle tragen entsprechende Kern- sowie Plastiden-

genome. Um den Albinismus durch mitochondrielle Defekte erklären zu können, müssten somit 29 unabhängige Ereignisse zu einem, die Plastidenentwicklung negativ beeinflussenden, mitochondriellen Defekt geführt haben. Ein äußerst unwahrscheinliches Szenario, bedenkt man, dass bisher keine rein albinotischen Pflanzen aufgrund mitochondrieller Defekte beschrieben sind, Albinismus aufgrund von plastidären Defekten jedoch häufig ist (z.B.: Allison *et al.* 1996; Sundberg *et al.* 1997; Till *et al.* 2001; Bauer *et al.* 2002; Kuroda und Maliga 2003).

4.2 Der Einfluss von Edierungsdefekten auf die Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität in der [Ab(Nt)]-Cybride

Die Identifizierung essentieller Nukleotidpositionen im *N. tabacum* Plastom, die den albinotischen Phänotyp der [Ab(Nt)]-Cybride erklären könnten, erfolgte mit Hilfe von Suppressormutanten und durch eine mittels somatischer Zellhybridisierung durchgeführte Komplementation des albinotischen Phänotyps.

4.2.1 Der albinotische Phänotyp der [Ab(Nt)]-Cybride beruht auf dem Edierungsdefekt in *atpA*-264

Beide Ansätze – Suppressormutanten und Komplementation – konvergierten in dem Ergebnis, dass das zweite Nukleotid in Codon 264 in *atpA* der Auslöser der Inkompatibilität zwischen dem *A. belladonna* Kerngenom und dem *N. tabacum* Plastidengenom sein könnte. Das in *N. tabacum* in *atpA* kodierte CCC Prolincodon an Position 264 wird durch RNA Edierung auf mRNA-Ebene in ein CUC Leucincodon überführt. Im Plastidengenom von *A. belladonna* ist das Leucin bereits auf DNA-Ebene kodiert (CTC). In der [Ab(Nt)]-Cybride verbleibt das *N. tabacum* spezifische CCC Codon unediert. Offensichtlich ist im *A. belladonna* Kerngenom aufgrund der Abwesenheit der plastidären Edierungsstelle (T auf DNA) kein funktionelles Allel für den entsprechenden Edierungsfaktor enthalten. In Folge des Edierungsdefektes in der [Ab(Nt)]-Cybride wird somit wahrscheinlich ein an dieser Aminosäureposition nicht konserviertes Prolin in das naszierende Polypeptid eingebaut.

Die Suppressormutation macht Edierung an dieser Position unnötig, da bereits auf DNA-Ebene wie in der „Wildtyp“ [Ab(Ab)]-Kombination das konservierte Leucin (CTC) kodiert ist. In der Komplementationslinie [Ab^{Nt}(Nt)] zeigte sich, dass die Kodierung für das konservierte Leucin, wie in *N. tabacum*, durch RNA Edierung auf mRNA-Ebene

hergestellt wird. Durch die Introgression genetischen Materials aus dem Nukleus von *N. tabacum* war offensichtlich der oder die benötigten Edierungsfaktoren für die Edierungsstelle *atpA-264* in das nukleäre Genom der [Ab(Nt)]-Cybride eingeführt worden.

4.2.1.1 Die partielle Edierung von *atpA-264* hat einen negativen Effekt auf die Pflanzenentwicklung

Zunächst wurde versucht die Auswirkung eines Edierungsdefekts in *atpA-264* in *N. tabacum* mittels einer Mutagenese des *cis*-Elements zu untersuchen. In der dazu hergestellten transplastomischen *N. tabacum* Linie, mA, wurden acht Basen innerhalb des Bereiches -19/+4 um die Edierungsstelle verändert. Dieser Bereich sollte innerhalb des für die Spezifitätsfaktorbindung essentiellen *cis*-Elements liegen (Bock *et al.* 1996; Chaudhuri und Maliga 1996; Hirose und Sugiura 2001). Es zeigte sich, dass diese Veränderung des *cis*-Elements nicht zu einem vollständigen Edierungsdefekt führte, sondern Teile der Transkriptpopulation noch ediert werden konnten. Dieses Ergebnis war überraschend, da sogar der Austausch einzelner Nukleotide innerhalb des *cis*-Elements Edierung vollständig blockieren kann (Bock *et al.* 1996; Miyamoto *et al.* 2004). Offensichtlich war der entsprechende Spezifitätsfaktor für *atpA-264* noch in der Lage die Edierungsstelle trotzdem zu erkennen, wenn auch mit verminderter Effizienz. Eine Erklärung wäre, dass ein Teil der essentiellen Erkennungssequenz außerhalb des von den Mutationen betroffenen Bereichs liegt, was für verschiedene Edierungsstellen zuzutreffen scheint (Bock *et al.* 1996; Sasaki, T. *et al.* 2006). Alternativ hierzu könnte das mutagenisierte *cis*-Element zufällig als Erkennungssequenz für einen Spezifitätsfaktor einer anderen Edierungsstelle dienen. Tatsächlich finden sich schwache Sequenzhomologien zu den *cis*-Elementen der Edierungsstellen *ndhB-196*, *ndhB-204*, *rpl23-24* sowie *rps14-27* (Abb. 4-1). Edierungsstellen mit *cis*-Elementen ähnlicher Homologie wurden in Cluster zusammengefasst, die eventuell vom gleichen Spezifitätsfaktor erkannt werden könnten (Chateigner-Boutin und Hanson 2002, 2003). Eine Koedierung der Edierungsstelle *atpA-264* mit verändertem *cis*-Element mit einer der genannten Edierungsstellen erscheint somit möglich.

```

tgaacgacacactctttataatatatacgacgaccCgtccaaa
ggtggggcaagctcttc...tatctctggtt..Catgggttt ndhB-196

tgaacgacacactctttataatatatacgacgaccCgtccaaa
gttcatgggtttctcttggc.tatatggt...tCatccggg ndhB-204

tgaacgacacactctttataatatatacgacgaccCgtccaaa
ggttattggggaaaaaatcaatatact.....tCtaatgtc rpl23-24

ctcttataaatata...cga.....cgac...cCgtccaaa
gaacagaaatatcattcgattcgatcctCaaagaaa rps14-27

```

Abbildung 4-1: Sequenzhomologien des veränderten *cis*-Elements der Edierungsstelle *atpA-264* in der Linie *mA* zu *cis*-Elementen anderer plastidären Edierungsstellen aus *N. tabacum*

Die *cis*-Elemente der Edierungsstellen *ndhB-196*, *ndhB-204*, *rpl23-24* und *rps14-27* zeigen schwache Sequenzhomologien zum veränderten *cis*-Element der *mA*-Mutanten. „C“: Edierungsstelle; hellgrau hinterlegt: angegebenes Codon mit Edierungsstelle; dunkelgrau hinterlegt: Sequenzhomologien innerhalb der putativen *cis*-Elemente; ausgegangen wurde von mindestens 5 aufeinanderfolgenden übereinstimmenden Nukleotiden; unter Einführung von Lücken wurde nach mind. 3 aufeinanderfolgenden übereinstimmenden Nukleotiden gesucht, so dass die Anzahl der Lücken die Anzahl der Übereinstimmungen nicht übersteigt.

Welche der Möglichkeiten zutrifft, die eine Edierung zumindest eines Teils der Transkriptpopulation ermöglicht, ist nicht vorauszusagen. Der Anteil edierten Transkripts ist jedenfalls deutlich, auf weniger als die Hälfte der *atpA*-Transkripte, reduziert.

Unter Standardbedingungen waren keinerlei sichtbare Folgen auf die Entwicklung der Pflanzen zu erkennen. Erst unter selektiven Bedingungen wie erhöhter Temperatur und direktem Sonnenlicht zeigte sich ein klarer Nachteil der *mA*-Linien im Vergleich zum Wildtyp. Sowohl die Chlorophyllakkumulation als auch das Wachstum war durch den partiellen Edierungsdefekt in *atpA-264* stark eingeschränkt. Als Ursache hierfür kann wahrscheinlich die deutlich niedrigere Akkumulation der durch *atpA* kodierten α -Untereinheit der plastidären F_0F_1 -ATPase ($CF_1\alpha$) angesehen werden. Obwohl auch unedierte Transkripte ribosomenassoziiert vorlagen, also translatiert werden, scheinen stabile Isoformen der $CF_1\alpha$ nur von edierten Transkripten hergestellt zu werden. Zumindest geht die partielle Edierung einher mit einer Reduktion immunologisch nachweisbaren Proteins. Ebenfalls reduziert war die β -Untereinheit, $CF_1\beta$, als direkter Interaktionspartner. Dies könnte die direkte Folge der mangelnden Verfügbarkeit von funktioneller $CF_1\alpha$ -Untereinheit sein. Für Thylakoidmembrankomplexe ist bekannt, dass die Akkumulation verschiedener Untereinheiten koordiniert reguliert werden kann (z.B. Kuras und Wollman 1994). Überflüssige Untereinheiten können dabei zum Beispiel proteolytisch beseitigt werden. Eine andere Möglichkeit ist, die Translation verschiedener Untereinheiten in

Abhängigkeit der Verfügbarkeit einer jeweils anderen Untereinheit zu regulieren, was als CES (control by epistasy of synthesis) bezeichnet wird (Wollman *et al.* 1995; Choquet *et al.* 1998). Für die plastidäre F_0F_1 -ATPase scheint tatsächlich – zumindest in *Chlamydomonas* – eine solche Regulation zu existieren. So sind der membranintegrale CF_0 -Komplex und der lösliche CF_1 -Komplex in ihrer Akkumulation voneinander abhängig. Dies gilt auch für einzelne Komponenten der jeweiligen Komplexe, wie z.B. $CF_1\alpha$ und $CF_1\beta$ (Überblick z.B. in Choquet und Vallon 2000).

Für vollständige Edierungsdefekte wurden bereits mutante Phänotypen beschrieben (Bock *et al.* 1994; Zito *et al.* 1997). Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse müssen aber auch partielle Edierungsdefekte für Funktionsstörungen in Betracht gezogen werden.

4.2.1.2 Ein Leucin an Aminosäureposition 264 in $CF_1\alpha$ ist essentiell für eine normale Chloroplastendifferenzierung

Nachdem ein vollständiger Edierungsdefekt durch eine Veränderung des *cis*-Elements der Edierungsstelle *atpA*-264 nur bedingt erfolgreich war, wurde versucht die Bedeutung der möglicherweise kritischen Aminosäureposition für den Albinismus der [Ab(Nt)]-Cybride über einen alternativen transplastomischen Ansatz in *N. tabacum* zu untersuchen. Eine AtpA L264W Substitution führte dabei in den Mutanten, ähnlich wie die angenommene AtpA L264P Substitution in der [Ab(Nt)]-Cybride, zu vollständiger Chlorophylldefizienz.

Ein Leucin an Position 264 in AtpA scheint somit essentiell für eine intakte Chloroplastendifferenzierung zu sein. Wie aus den Suppressormutanten ersichtlich wird, scheint es dabei keine Rolle zu spielen, ob es auf DNA-Ebene kodiert ist, oder auf mRNA-Ebene durch Edierung hergestellt wird.

Es bestand jedoch weiterhin die Möglichkeit, dass andere, nicht identifizierte plastidäre Mutationen in den Suppressormutanten oder andere essentielle Faktoren für die Chloroplastendifferenzierung in der Komplementationslinie mitverantwortlich für die Ergrünung hätten sein können. Um zu bestätigen, dass der identifizierte Polymorphismus tatsächlich allein die Fehlentwicklung der [Ab(Nt)]-Cybride verantwortet, wurde das identifizierte Nukleotid (*atpA*-264:CCC) mit Hilfe eines transplastomischen Ansatzes in *N. tabacum* an die *A. belladonna* Sequenz

angeglichen (*atpA*-264:CTC). Dieses Plastidengenom wurde mit dem *A. belladonna* Kerngenom kombiniert. Die erhaltenen [Ab(Nt:CTC)]-Cybriden waren in der Lage Chlorophyll zu akkumulieren und auf Erde photoautotroph zu wachsen. Zur Kontrolle hergestellte [Ab(Nt:CCC)]-Cybriden, die nur den für die Plastidentransformation nötigen Selektionsmarker trugen, nicht jedoch die Punktmutation, waren phänotypisch nicht von der ursprünglichen albinotischen [Ab(Nt)]-Cybride zu unterscheiden. Der einzige Unterschied im plastidären Genom zwischen den grünen [Ab(Nt:CTC)]-Cybriden und den weißen [Ab(Nt:CCC)]-Cybriden ist die zweite Nukleotidposition in *atpA*-264. Der Albinismus der [Ab(Nt)]-Cybride kann also auf genau einen Edierungsdefekt und somit ein einziges Nukleotid zurückgeführt werden. Das photoautotrophe Wachstum der [Ab(Nt:CTC)]-Cybriden zeigt, dass möglicherweise zusätzlich gestörte Interaktionen, die zur Inkompatibilität zwischen dem *A. belladonna* Kerngenom und dem Plastidengenom von *N. tabacum* beitragen könnten, weitaus weniger gravierend sind.

Die aus dem Edierungsdefekt wahrscheinlich resultierende AtpA L264P Substitution scheint in der [Ab(Nt)]-Cybride die Funktion der α -Untereinheit der löslichen F_1 -Komponente der plastidären F_0F_1 -ATPase, $CF_1\alpha$, soweit zu beeinträchtigen, dass die Chloroplastendifferenzierung zum Erliegen kommt. Das Gleiche gilt für die AtpA L264W Substitution in *N. tabacum* WAT-Mutanten.

Auf molekularer Ebene wurde in den albinotischen Pflanzen eine starke Reduktion des *atpA*-Transkripts nachgewiesen. Eine ähnliche Reduktion der *atpA*-Transkripte ist aber auch für photosynthetisch nicht aktive *N. tabacum* BY-2 Zellen beschrieben (Miyagi *et al.* 1998). Pleiotrope Veränderungen in der Transkriptakkumulation und Transkriptmustern plastidärer Operons sind in der Tat typisch für albinotische Mutanten (Han *et al.* 1993; Silhavy und Maliga 1998; Zubko und Day 2002; Williams und Barkan 2003). Es ist also unwahrscheinlich, dass der Edierungsdefekt oder die Mutation einen direkten Einfluss auf die Transkriptakkumulation von *atpA* hat. Vielmehr scheint die reduzierte Transkriptmenge Folge und nicht Ursache des albinotischen Phänotyps zu sein. Andere Transkripte akkumulieren normal. In der *N. tabacum* WAT-Mutante konnte das z.B. für den eingebrachten Resistenzmarker, *aadA*, gezeigt werden. Auch in der [Ab(Nt)]-Cybride akkumulieren verschiedene plastidäre Transkripte ähnlich wie in *A. belladonna* oder *N. tabacum* (Schmitz-

Linneweber 2002). Die albinotischen Linien sind also nicht generell in der plastidären Transkription gestört.

Die Transkriptmenge von *atpA* war stark reduziert, aber nachweisbar. Das Produkt, CF₁α, konnte hingegen in Westernanalysen nicht detektiert werden. Einerseits könnte die reduzierte Transkriptmenge limitierend sein, was jedoch nicht die vollständige Abwesenheit des Genproduktes erklären kann. Andererseits könnte die durch den Edierungsdefekt wahrscheinliche Aminosäuresubstitution oder die Aminosäuresubstitution durch die Mutation zu einer instabilen Proteinisoform führen. Neben CF₁α, als Untereinheit der F₀F₁-ATPase, waren auch weitere untersuchte Untereinheiten der anderen Hauptkomplexe des photosynthetischen Elektronentransports betroffen. PsaC, PsbE und PetA der Photosysteme I und II sowie des Cytochrom b₆f Komplexes waren weder in der [Ab(Nt)]-Cybride noch in der *N. tabacum* WAT-Mutante immunologisch nachweisbar. Elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigten den völligen Zusammenbruch des für Chloroplasten charakteristischen und für die Photosynthese essentiellen Thylakoidmembransystems. Ein direkter Zusammenhang zwischen Edierungsdefekt bzw. Mutation und der Stabilität von CF₁α ist also nicht zwingend, vielmehr hat der Defekt in der Thylakoid-ATPase eine wesentlich weitreichendere negative Auswirkung auf die Akkumulation vieler – wenn nicht sogar aller – Photosynthese-assoziiierter Proteine.

Diese reduzierte Akkumulation verschiedener Proteine in den albinotischen Linien könnte bereits auf einem Translationsdefekt basieren. Alternativ hierzu wäre aber auch eine posttranslationale Degradierung denkbar. Die Expression des Resistenzmarkers in den Plastiden der *N. tabacum* WAT-Mutante ist Voraussetzung für die Selektion auf die eingeführte Mutation. Allein die Existenz dieser albinotischen Mutante beweist somit, dass die Translation in den Plastiden der WAT-Mutante funktioniert. Für die [Ab(Nt)]-Cybride war ein genereller plastidärer Translationsdefekt bereits früher ausgeschlossen worden (Schmitz-Linneweber 2002). Die hier untersuchten albinotischen Linien sind also grundsätzlich in der Lage Proteine innerhalb der Plastide zu synthetisieren. Bei der gestörten Akkumulation photosyntheseassoziiierter Proteine scheint es sich also eher um einen posttranslationalen Effekt zu handeln. Unklar ist jedoch, ob die funktionslose CF₁α-Untereinheit der ATPase direkt abgebaut wird, oder aber zunächst ein nicht-funktioneller Komplex

assembliert wird, der dann im weiteren Verlauf wie die anderen hier untersuchten photosyntheseassoziierten Proteine abgebaut wird.

Die Ursache des Verlustes aller für die Photosynthese essentieller Strukturen ist jedoch zweifelsfrei die defekte CF₁α-Untereinheit der plastidären F₀F₁-ATPase.

4.2.1.3 Der Albinismus der [Ab(Nt)]-Cybride und der *Nicotiana tabacum* WAT-Mutante kann pharmakologisch phänokopiert werden

Albinismus, wie er hier aufgrund des Defektes in CF₁α ausgelöst wird, war bisher in Landpflanzen für Mutanten, die in der plastidären F₀F₁-ATPase betroffen sind, nicht beschrieben. Nukleäre Maismutanten mit stark reduzierter *atpA*-Expression sind beispielsweise hellgrün, bevor die Keimlinge nach ca. drei Wochen absterben (Jenkins *et al.* 1997; McCormac und Barkan 1999). Sie zeigen also eine schwächer ausgeprägte Pigmentdefizienz, als dies für die [Ab(Nt)]-Cybride oder die *N. tabacum* WAT-Mutante der Fall ist. Eine *A. thaliana* T-DNA-Insertionsmutante (*dpa1*) in *atpC1* zeigt ebenfalls Keimlingssterblichkeit (dal Bosco *et al.* 2004). Solche Mutanten konnten – ebenfalls wie albinotische Mutanten – nur über *in vitro* Kultur gerettet werden, zeigten dann aber eine „fast normale Pigmentierung“ (dal Bosco *et al.* 2004). Die essentielle Funktion der Thylakoid-ATPase ist nicht überraschend, der hier beobachtete Albinismus aufgrund der Substitution einer einzigen Aminosäure in CF₁α schien jedoch ungewöhnlich zu sein.

Neben den angeführten und weiteren genetischen Studien gibt es auch pharmakologische Untersuchungen der plastidären F₀F₁-ATPase. Das fungale Herbizid Tentoxin inhibiert die ATP-Synthese in Chloroplasten sensibler Pflanzenarten. Die inhibierte Photophosphorylierung geht dabei einher mit chlorotischen Effekten (Steele *et al.* 1976). Plastiden in Kotyledonen von Gurkenkeimlingen, die mit Tentoxin behandelt wurden, zeigen ähnliche ultrastrukturelle Merkmale wie die [Ab(Nt)]-Cybride und die *N. tabacum* WAT-Mutante (Halloin *et al.* 1970). Ebenso ist die Akkumulation verschiedener plastidärer Proteine, wie. z.B. CF₁α, CF₁β, LHClI und RbcL, in sensiblen Arten stark reduziert (Holland *et al.* 1998). Albinismus, wie er in der [Ab(Nt)]-Cybride und der WAT-Mutante in Folge einer defekten CF₁α-Untereinheit auftritt, kann also durch Tentoxin phänokopiert werden.

Die Sensitivität verschiedener Pflanzenarten gegenüber Tentoxin wurde als abhängig von der an Codonposition 83 in *atpB* kodierten Aminosäure beschrieben (Avni *et al.* 1992). Neben der Interaktion von Tentoxin mit $CF_1\beta$ wurden jedoch zunehmend auch Interaktionen mit der $CF_1\alpha$ -Untereinheit diskutiert (Santolini *et al.* 1998; Tucker *et al.* 2000; Tucker *et al.* 2001). Die Modellierung des Tentoxinmoleküls in ein 3D-Strukturmodell der CF_1 aus Spinat zeigte an der Grenzfläche der α und β Untereinheit eine Tasche, bestehend aus vier Tyrosinresten, $\alpha Y237$, $\alpha Y241$, $\alpha Y271$ und $\alpha Y293$, die potentiell mit Tentoxin interagieren könnten (Minoletti *et al.* 2002). Basierend auf der Kristallstruktur einer mit Tentoxin komplexierten plastidären F_1 -ATPase, ebenfalls aus Spinat, wurden hydrophobe Wechselwirkungen von Tentoxin mit $\alpha I63$, $\alpha L65$, $\alpha V75$, $\alpha Y237$, $\alpha L238$ und $\alpha M274$ beschrieben (Groth 2002). Offensichtlich beeinträchtigt Tentoxin durch die Interaktion mit $CF_1\alpha$ innerhalb dieser Region massiv die Funktion der Thylakoid-ATPase.

Die für den Defekt in [Ab(Nt)]-Cybriden verantwortliche Aminosäureposition 264 in $CF_1\alpha$ ist Teil einer α -helikalen Sekundärstruktur. Zwei Aminosäuren, $\alpha Y271$ (Minoletti *et al.* 2002) und $\alpha M274$ (Groth 2002), die in die Interaktion mit Tentoxin involviert zu sein scheinen, befinden sich ebenfalls innerhalb dieser α -Helix. In der [Ab(Nt)]-Cybride ist aufgrund des Edierungsdefektes eine AtpA L264P-Substitution erwartet. Prolin könnte als „Helixbrecher“ somit möglicherweise einen ähnlichen Effekt wie Tentoxin haben. Ähnliches könnte auch für die AtpA L264W-Substitution in der WAT-Mutante gelten, da Tryptophan erheblich größer als Leucin ist und somit ebenfalls zu strukturellen Veränderungen führen sollte.

Der Mechanismus der Inhibierung der ATPase durch Tentoxin ist noch nicht vollständig aufgeklärt. In der löslichen F_1 -Untereinheit von F-ATPasen sind jeweils drei α - und drei β -Untereinheiten alternierend ringförmig angeordnet. Eine α - und eine β -Untereinheit bilden dabei zusammen jeweils eine katalytische Einheit. Jede dieser katalytischen ($\alpha\beta$)-Einheiten liegt in einer unterschiedlichen Konformation vor, die die Affinität zum Nukleotid bestimmt. Im Zentrum der drei katalytischen ($\alpha\beta$)-Einheiten rotiert die γ -Untereinheit, angetrieben durch einen Protonenfluss über die membranständige F_0 -Untereinheit. Die Stellung der γ -Untereinheit bestimmt dabei letztlich gleichzeitig die verschiedenen Konformationen der drei katalytischen ($\alpha\beta$)-Untereinheiten (Übersichtsartikel: Weber und Senior 2003). Die Inhibierung der CF_1

kann durch ein einziges Tentoxinmolekül erfolgen (Santolini *et al.* 1999; Minoletti *et al.* 2002). Tentoxin blockiert vermutlich, vergleichbar mit einem Keil, der zwischen die α - und β -Untereinheit gesteckt ist, die Konformationsänderung hin zur offenen, nicht durch ein Nukleotid besetzten Form einer katalytischen ($\alpha\beta$)-Untereinheiten (Groth 2002; Minoletti *et al.* 2002). Untersuchungen der zu CF₁ homologen TF₁-Untereinheit der F-ATPase des thermophilen *Bacillus PS3* zeigen, dass durch Tentoxin die Rotation der γ -Untereinheit während der ATP-Hydrolyse *in vitro* vollständig unterbunden wird (Pavlova *et al.* 2004). Dies legt nahe, dass die mittels Tentoxin blockierte Konformationsänderung einer ($\alpha\beta$)-Einheit zur Blockierung der γ -Untereinheit führt und somit der Protonenfluss zum Erliegen kommt. Dadurch kommt es vermutlich zu einer Überenergetisierung der Thylakoidmembran, in deren Folge vermehrt Chlorophyll im Triplettzustand (³Chl) und Singulett-Sauerstoff (¹O₂) sowie Superoxidanionen (O₂⁻) entstehen können (Holland *et al.* 1997). Damit zeigt sich der gleiche Effekt wie bei durch starker Belichtung ausgelöster photooxidativer Zerstörung von Thylakoidmembrankomponenten (Übersichtsartikel z.B.: Niyogi 1999). Der Hauptangriffspunkt unter photooxidativem Stress ist zwar das Photosystem II (Barber und Andersson 1992; Aro *et al.* 1993), allerdings können sämtliche Pigmente, Lipide und Proteine direkt durch die entstehenden hochreaktiven Moleküle oxidiert werden (Knox und Dodge 1985).

Mutanten, die die chloroplastidäre Superoxiddismutase überexprimieren sind im Vergleich zu Wildtyppflanzen weniger empfindlich gegenüber Tentoxin. Eine gesteigerte Umsatzrate von O₂⁻ kann offensichtlich die Toleranz gegenüber Tentoxin erhöhen. Auch durch die Zugabe von Ascorbinsäure als Antioxidans in das Kulturmedium konnte die Wirkung von Tentoxin herabgesetzt werden (Holland *et al.* 1997).

Die durch Tentoxin ausgelöste Chlorose könnte also tatsächlich durch eine vermehrte Akkumulation hochreaktiver Chlorophyll- und Sauerstoffspezies an der Thylakoidmembran erklärt werden.

Ein Schutzmechanismus gegen ein erhöhtes Aufkommen an hochreaktiven Molekülen, wie ³Chl und ¹O₂, besteht in der Akkumulation von Carotinoiden (Übersicht und Referenzen in: Niyogi 1999). Dies scheint in albinotischen Thylakoid-ATPase-Mutanten bereits bei Schwachlicht der Fall zu sein (Ralph Bock, persönliche Kommunikation), was ein weiteres Indiz für die Akkumulation reaktiver Moleküle an der Thylakoidmembran in Folge einer defekten Thylakoid-ATPase ist.

Mit Aminosäureposition 264 in CF₁ α ist eine Domäne betroffen, deren Struktur essentiell für die Funktion zu sein scheint. Eine strukturelle Veränderung aufgrund einer Aminosäuresubstitution an Position 264 in CF₁ α könnte die Funktion der ATPase in ähnlicher Weise negativ beeinflussen wie das Phytotoxin Tentoxin. Selbst wenn also die nicht-funktionsfähige CF₁ α -Untereinheit nicht unmittelbar degradiert wird und zunächst mit den anderen Untereinheiten assembliert wird, bleibt der Effekt des völligen Verlustes des Photosyntheseapparates erklärbar. Ähnlich wie für Tentoxin, könnte der blockierte Energietransfer zu einer Überenergetisierung der Thylakoidmembran und in der Folge zur Zerstörung sämtlicher ihrer Komponenten führen.

4.2.2 Weitere Edierungsdefekte in [Ab(Nt)]-Cybriden könnten zur Inkompatibilität beitragen

Der Edierungsdefekt in *atpA*-264 ist der Auslöser für den albinotischen Phänotyp der [Ab(Nt)]-Cybride. Neben diesem waren aber weitere Edierungsdefekte für tabak-spezifische Edierungsstellen in der [Ab(Nt)]-Cybride identifiziert worden (Schmitz-Linneweber 2002). *ndhD*-200 und -225 blieben wie *atpA*-264 im fremden Kern-hintergrund unediert, *rps14*-50 war partiell ediert. Auch für eine nicht artspezifische Edierungsstelle, *ndhG*-17, die sowohl in *A. belladonna* als auch in *N. tabacum* vorhanden ist (C auf DNA, C-U Edierung), wurde ein Defekt der Prozessierung in der [Ab(Nt)]-Cybride identifiziert. Vermutlich beruht dieser Defekt auf einem Unterschied im *cis*-Element der Edierungsstelle. Die Adaptation des entsprechenden Spezifitäts-faktors auf das jeweilige *cis*-Element könnte dazu führen, dass die artfremde Edierungsstelle nicht mehr erkannt wird.

Eine Wertung der Relevanz dieser Edierungsdefekte auf die Inkompatibilität des *A. belladonna* Kerngenoms mit dem Plastidengenom aus *N. tabacum* ist ohne die Untersuchung jeder einzelnen dieser Edierungsstellen schwierig. Eine Abschätzung kann nur anhand der Funktion des jeweils betroffenen Proteins durchgeführt werden und/oder durch Betrachtung der Daten zur Edierung der jeweiligen Stelle in anderen Arten oder Linien.

rps14 kodiert für ein ribosomales Protein und scheint für die Pflanzenentwicklung unentbehrlich zu sein (Ahlert *et al.* 2003). Somit könnte der partielle Edierungsdefekt

in *rps14-50* unter bestimmten Vorraussetzungen durchaus negative Auswirkungen haben (vgl. mA-Mutanten). Die anderen Edierungsdefekte betreffen *ndh*-Gene, die für Untereinheiten des plastidären NDH-Komplexes kodieren, dessen Funktion immer noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Er scheint eine Rolle im zyklischen Elektronentransport zu spielen und hauptsächlich unter Stressbedingungen aktiviert zu werden (z.B.: Casano *et al.* 2001). Mutanten, die den NDH-Komplex betreffen, zeigen unter Standardbedingungen keine offensichtlichen Phänotypen (Burrows *et al.* 1998; Kofer *et al.* 1998; Shikanai *et al.* 1998; Horvath *et al.* 2000; Kotera *et al.* 2005). Deshalb sind drastische Effekte, wie z.B. ein albinotischer Phänotyp, durch die fehlende Edierung dieser Stellen nicht zu erwarten.

Die Edierungsdefekte der albinotischen [Ab(Nt)]-Cybride an *N. tabacum* spezifischen Edierungsstellen, *ndhD-200* und *-225* und *rps14-50*, waren in den grünen Suppressorlinien [Ab(Nt^m)] und [Ab(Nt:CTC)] ebenfalls erhalten. Photoautotrophes Wachstum ist also auch trotz dieser Edierungsdefekte möglich. Edierung in *ndhG-17* scheint ebenfalls entbehrlich zu sein. Zumindest verbleibt diese Edierungsstelle auch in *Nicotiana tomentosiformis* unediert – offensichtlich ohne Auswirkung (nicht gezeigt).

Keiner der Edierungsdefekte hat einen Einfluss auf den Albinismus der [Ab(Nt)]-Cybride. Gänzlich ausgeschlossen werden kann ein Beitrag dieser Defekte zur Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität in der [Ab(Nt)]-Cybride aber nicht.

4.2.3 Der Einfluss des Polymorphismus in *rpoC2* auf die Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität in der [Ab(Nt)]-Cybride

Die Suche nach der molekularen Ursache, die die Inkompatibilität in der vorliegenden Kombination des Kern- und Plastidengenoms der beiden Solanaceen-Arten auslöst, hatte zunächst zu einem Unterschied im plastidär kodierten *rpoC2*-Gen geführt. *rpoC2* kodiert für eine Untereinheit der plastidär kodierten RNA Polymerase (PEP), die homolog zur eubakteriellen RNA Polymerase ist. Bei dem Unterschied handelt es sich um eine Insertion/Deletion in einem Bereich des *rpoC2*-Gens, der im entsprechenden Genprodukt für die Interaktion mit nukleär kodierten Sigmafaktoren verantwortlich ist (Igloi und Kössel 1992; Arthur und Burgess 1998; Arthur *et al.* 2000). *rpoC2* ist außerdem eines der am schnellsten evolvierenden plastidären Gene (Cummings *et al.* 1994). Mit der interkompartimentellen Interaktion

und der schnellen Evolution waren zwei Voraussetzungen für Faktoren erfüllt, die eine Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität in engeren Verwandtschaftskreisen auslösen können. Zudem sind für Nullmutanten von *rpo*-Genen pigmentdefiziente Phänotypen beschrieben (Allison *et al.* 1996; De Santis-Maclossek *et al.* 1999), was die essentielle Funktion der PEP für die Chloroplastendifferenzierung zeigt und den Phänotyp der [Ab(Nt)]-Cybride erklären hätte können.

4.2.3.1 Die Insertion/Deletion in *rpoC2* ist nicht verantwortlich für die Pigmentdefizienz in der [Ab(Nt)]-Cybride

Um den Einfluss dieses Polymorphismus auf die Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität in der [Ab(Nt)]-Cybride zu untersuchen waren transplastomische *N. tabacum* Linien hergestellt worden, die an der entsprechenden Position in *rpoC2* die *A. belladonna* spezifische Deletion trugen. Wäre der Polymorphismus in *rpoC2* die einzige Ursache des albinotischen Phänotyps der [Ab(Nt)]-Cybride gewesen, hätte die Eliminierung dieses Unterschieds zu einer intakten Chloroplastendifferenzierung und somit zu photoautotrophen Wachstum führen müssen.

Die als Plastomdonor für die Herstellung der [Ab(Nt:AbrpoC2)]-Cybriden verwendeten transplastomischen Tabaklinien [Nt(Nt:AbrpoC2)] sowie die entsprechenden Kontrolllinien [Nt(Nt:NtrpoC2)] zeigten eine schwach ausgeprägte Chlorophylldefizienz. Die Ursache lag wahrscheinlich in der in unmittelbarer Nähe zum Stop-Codon eingebrachten *aadA*-Kassette, die als Selektionsmarker diente. Somit wäre im Fall einer Herstellung der Kompatibilität ein entsprechend hellgrüner Phänotyp erwartet worden, wie er für die transplastomischen Tabaklinien [Nt(Nt:AbrpoC2)] und [Nt(Nt: NtrpoC2)] beobachtet worden war.

Ein Austausch des entsprechenden *rpoC2*-Fragments im *N. tabacum* Plastidengenom gegen das *A. belladonna* spezifische Fragment führte jedoch ausschließlich zu albinotischen [Ab(Nt:AbrpoC2)]-Cybriden. Somit konnte der Polymorphismus in *rpoC2* nicht als Hauptursache für den albinotischen Phänotyp der [Ab(Nt)]-Cybride angesehen werden.

Unklar war jedoch zunächst, ob der Unterschied in *rpoC2* möglicherweise in geringerem Ausmaß zur Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität in der [Ab(Nt)]-Cybride beitragen könnte. Die Eliminierung des Edierungsdefekts in *atpA*-264 führte jedoch zu photoautotrophen Cybriden, obwohl der Polymorphismus in *rpoC2* und damit eine

mögliche gestörte Interaktion von Sigmafaktoren mit dem Apoenzym der plastidär kodierten RNA-Polymerase immer noch vorhanden waren. Der Polymorphismus in Form einer Insertion/Deletion in *rpoC2* spielt somit für den albinotischen Phänotyp der [Ab(Nt)]-Cybride – wenn überhaupt – nur eine sehr untergeordnete Rolle.

4.2.3.2 Im Kernhintergrund von *Atropa belladonna* sind die eigenen Plastidengenome gegenüber denen aus *Nicotiana tabacum* bevorzugt

Zur Kontrolle durchgeführte somatische Zellhybridisierungen der *A. belladonna* Linie Ab5 als Kerngenomdonor und der Tabak-Kontrolllinie C2N [Nt(Nt:NtrpoC2)] als Plastomdonor führten mit zwei Ausnahmen zu den erwarteten albinotischen Cybriden, die sich genotypisch von den ursprünglichen [Ab(Nt)]-Cybriden nur durch den eingefügten Selektionsmarker unterscheiden sollten. Alle getesteten albinotischen Linien hatten den Genotyp [Ab(Nt:NtrpoC2)]. Die beiden unter Selektionsdruck zunächst albinotischen Linien F1CLN-6 und F1CLN-7, die später auf nicht-selektivem Medium grüne Sektoren entwickelten und nach einem weiteren Regenerationszyklus vollständig grün waren, besaßen jedoch Plastidengenome, die vom Kerngenomdonor *A. belladonna* stammten. Es handelt sich also nicht um die erwarteten Cybriden, sondern um Linien deren Genotyp [Ab(Ab)] dem des Kerngenomdonors entspricht. Offensichtlich befanden sich diese Linien zum Zeitpunkt des Transfers auf nicht-selektives Medium noch in einem heteroplastomischen Zustand. Die verbliebenen Plastidenchromosomen aus *A. belladonna* bildeten dann den Ausgangspunkt für die Entwicklung von photosynthetisch aktivem, grünen Gewebe, das erfolgreicher als weißes Gewebe war und dieses verdrängte. Trotz fehlender Notwendigkeit auf Saccharose-supplementiertem Medium Photosynthese betreiben zu müssen, wurde die Kombination des *A. belladonna* Kerngenoms [Ab] mit dem eigenen Plastidengenom [(Ab)] stark favorisiert. Offensichtlich hat photosynthetisch aktives Gewebe erhebliche Vorteile. Durch die mangelnde photosynthetische Aktivität könnten in der Cybride somit möglicherweise sekundär weitere Stoffwechselwege betroffen sein, die in ihrer Funktion eingeschränkt sind.

4.3 Bilden plastidäre Edierungsstelle und Spezifitätsfaktor eine evolutive Einheit?

Die Edierungsdefekte in der [Ab(Nt)]-Cybride bestätigten zum Teil frühere Ergebnisse, die zwischen Edierungsstelle und Spezifitätsfaktor eine evolutionäre Abhängigkeit beschrieben hatten. Der interspezifische Transfer plastidärer Edierungsstellen hatte gezeigt, dass funktionelle Allele im entsprechenden nukleären Genom nur vorhanden sind, wenn zu der eingebrachten Edierungsstelle eine homologe Edierungsstelle im Plastidengenom vorhanden ist (Bock *et al.* 1994; Reed und Hanson 1997). Der Verlust der Edierungsstelle (T auf DNA), so wurde angenommen, würde zum schnellen Verlust des Spezifitätsfaktors führen. So wäre nicht nur das Muster der Edierungsstellen artspezifisch, auch die spezifischen *trans*-Faktoren würden dieses Muster reflektieren.

4.3.1 Die Edierung heterologer, nicht endogener Stellen ist keine Ausnahme

Zum ersten Mal konnte Edierung einer heterologen, nicht-endogenen Edierungsstelle, *ndhA*-189, aus *Spinacia oleracea* in *N. tabacum* gezeigt werden. Dabei wurde vermutet, dass der spezifische Edierungsfaktor im allotetraploiden *N. tabacum* vom väterlichen Vorfahren ererbt worden war, dessen rezenter Vertreter *N. tomentosiformis* diese Edierungsstelle besitzt und auch prozessiert (Schmitz-Linneweber *et al.* 2001).

Ähnlich könnte es sich für die hier untersuchte Edierungsstelle *ndhD*-293 verhalten. Diese Edierungsstelle ist im Vergleich mit *N. tabacum* spezifisch für *N. glutinosa* und *A. belladonna*, d.h. in *N. glutinosa* und *A. belladonna* wird das auf DNA kodierte C durch RNA Edierung auf RNA-Ebene in ein U überführt, während in *N. tabacum* bereits das T auf DNA-Ebene kodiert ist. Der ursprünglichen Annahme folgend, sollte diese Edierungsstelle also im fremden Kernhintergrund von *N. tabacum* nicht ediert werden. Das Gegenteil war jedoch der Fall. Die Analyse der Edierungsstelle *ndhD*-293 in *N. tabacum* var. SNN, also einer Kombination des *N. tabacum* Kerngenoms mit dem Plastidengenom von *N. glutinosa*, zeigte, dass die Edierungskapazität für diese heterologe Edierungsstelle trotz der Abwesenheit der Edierungsstelle im „eigenen“ Plastidengenom (T auf DNA) erhalten war. Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch die Analyse der homologen Edierungsstelle in der reversen Cybride

[Nt(Ab)] (Tillich *et al.* 2006b). Wie *ndhA*-189 ist auch die Edierungsstelle *ndhD*-293 in *N. tomentosiformis* erhalten und wird prozessiert (Tillich *et al.* 2006b). Der Spezifitätsfaktor im *N. tabacum* Kerngenom könnte somit, wie für die Edierungsstelle *ndhA*-189, vorgeschlagen vom männlichen Elter, *N. tomentosiformis*, stammen (vgl. Schmitz-Linneweber *et al.* 2001).

Für die Edierungsstelle *ndhA*-189 konnte jedoch im Zuge der Doktorarbeit meines Kommilitonen Michael Tillich gezeigt werden, dass auch der rezente Vertreter des weiblichen Vorfahrens von *N. tabacum* und damit der Plastidendonator, *N. sylvestris*, die Edierungskapazität besitzt, obwohl, wie in *N. tabacum*, die Edierungsstelle abwesend ist (T auf DNA, Tillich *et al.* 2006b). Es zeigte sich also, dass nicht wie ursprünglich angenommen, die Allotetraploidisierung, die zur Entstehung der Art *N. tabacum* führte, für die Edierungskapazität für die Edierungsstelle *ndhA*-189 verantwortlich ist. Der entsprechende Edierungsfaktor ist bereits im diploiden Kerngenom des maternalen Elters, *N. sylvestris*, vorhanden, obwohl auch hier die Edierungsstelle im Plastom fehlt. Für die heterolog edierte Stelle *ndhD*-293 stehen diese Untersuchungen aus, ein vergleichbares Szenario wäre jedoch möglich.

Eine Zusammenfassung sämtlicher, auf heterologe Edierung getesteter Edierungsstellen zeigt, dass von bisher zehn Edierungsstellen, die auf heterologe Edierung in einem fremden Kernhintergrund untersucht wurden, vier in einem fremden Kernhintergrund ediert wurden. Entgegen der bisherigen Annahme handelt es sich also bei heterologer Edierung also nicht um eine Ausnahme.

4.3.2 Spezifitätsfaktoren zeigen Unterschiede in ihrer evolutionären Stabilität

Generell scheinen heterolog prozessierte Edierungsstellen, wie sie im vorigen Kapitel beschrieben sind, phylogenetisch weit verbreitet zu sein. Die Edierungsfaktoren sind trotz der Abwesenheit der Edierungsstelle (T auf DNA) erhalten. Dagegen werden Edierungsstellen, die auf wenige Arten beschränkt sind, nicht heterolog ediert. Hierfür fehlen die entsprechenden Spezifitätsfaktoren im fremden Kerngenom der entsprechenden Art, die diese Edierungsstelle im plastidären Genom nicht besitzt (T auf DNA). Die für phylogenetisch weit verbreitete Edierungsstellen verantwortlichen Spezifitätsfaktoren scheinen also eine höhere evolutionäre Stabilität

aufzuweisen, als die für weniger weit verbreitete Edierungsstellen. Betrachtet man den nach der Allotetraploidisierung weiter im Kerngenom von *N. tabacum* erhaltenen Spezifitätsfaktor für die Edierungsstelle *ndhA*-189, wird die Annahme einer relativ hohen evolutionären Stabilität mancher Faktoren weiter unterstützt. Die Allotetraploidisierung ist zwar nicht der Grund für die Bereitstellung des Edierungsfaktors, ein solcher Prozess kann jedoch bereits innerhalb weniger Generationen zum Verlust redundanten Erbguts führen (z.B. Gastony 1991; Guo *et al.* 1996; Liu *et al.* 1998; Galitski *et al.* 1999; Lim *et al.* 2000). Es ist also verwunderlich, dass selbst nach massiven Umstrukturierungen, in Folge der Allotetraploidisierung, genetisches Material ohne offensichtliche Aufgabe funktionell erhalten bleibt – in diesem Fall der Edierungsfaktor für eine nicht vorhandene Edierungsstelle.

Für den Erhalt eines funktionellen Allels des Edierungsfaktors trotz Abwesenheit der Edierungsstelle müsste also ein anderer Selektionsdruck als die Edierung der entsprechenden Stelle angenommen werden. Eine weitere Funktion von Edierungsfaktoren, die einen solchen Selektionsdruck darstellen könnte, wurde bereits früh als Grundlage für ein Modell zur Evolution von RNA Edierung gefordert (Covello und Gray 1993). Über die Art dieser weiteren Funktion kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch nur spekuliert werden. Die Edierung einer weiteren Edierungsstelle wäre die einfachste Möglichkeit. Hiernach würden also mehrere Edierungsstellen durch einen Spezifitätsfaktor bedient werden. Dies ginge konform mit der Einteilung von Edierungsstellen in Cluster aufgrund von Sequenzähnlichkeiten innerhalb der putativen *cis*-Elemente (Chateigner-Boutin und Hanson 2002, 2003; Tillich *et al.* 2005).

Edierungsfaktoren könnten aber auch in andere zelluläre Prozesse involviert sein. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist erst ein Spezifitätsfaktor für die Edierungsstelle *ndhD*-1 identifiziert (Kotera *et al.* 2005). Dabei handelt es sich um ein PPR-Protein (Pentatricopeptid Repeat), also ein Mitglied einer relativ heterogenen Proteinfamilie RNA-bindender Proteine, die vielfältige Funktionen im organellären RNA-Metabolismus wahrnehmen können (Lurin *et al.* 2004). Die postulierte zweite Funktion eines evolutionär stabilen Spezifitätsfaktors könnte also vielfältiger Natur sein und müsste primär nicht mit RNA Edierung in Verbindung stehen. Die Identifizierung weiterer Edierungsfaktoren wird Aufschluss über weitere Funktionen der Edierungsfaktoren geben.

Im Umkehrschluss würde die Annahme einer zweiten Funktion für evolutionär stabile Edierungsfaktoren bedeuten, dass evolutionär weniger stabile Edierungsfaktoren keine zusätzliche Funktion neben der Edierung einer bestimmten Edierungsstelle haben sollten. Für eine solche Spezialisierung müsste eine Genduplikation und Adaptation durch Koevolution mit der entsprechenden Edierungsstelle vorausgesetzt werden (vgl. hierzu Covello und Gray 1993). Ein Verlust der Edierungsstelle (C-T Mutation) könnte somit ohne Konsequenz für den jeweiligen Organismus zum Verlust des entsprechenden Edierungsfaktors führen.

Eine Korrelation von heterologer Edierung und phylogenetischer Verbreitung der Edierungsstelle kann momentan am einfachsten durch eine unterschiedliche evolutionäre Stabilität verschiedener Faktoren erklärt werden. Ein Spezifitätsfaktor, der beispielsweise aufgrund einer zweiten essentiellen Funktion evolutionär stabil ist und phylogenetisch weit, oder sogar ubiquitär, verbreitet ist, bleibt auch nach dem Verlust der Edierungsstelle (C-T Mutation) erhalten. Entsteht die Edierungsstelle (wieder) durch eine T-C Mutation, hat dies keine Konsequenz auf die Kodierung und damit die Funktion des betroffenen Genproduktes. Die evolutionäre Stabilität des Faktors ermöglicht also eine Fluktuation der entsprechenden Edierungsstelle über viele Taxa hinweg, was sich in der weiten phylogenetischen Verbreitung dieser Edierungsstelle widerspiegelt.

4.4 RNA Edierung als genereller Faktor für Kern-Organellen-Inkompatibilität und postzygotische Isolation

Die postzygotische Isolation von Arten kann sich in Hybridensterblichkeit oder Hybridensterilität äußern. Diesem Phänomen liegen nach Dobzhansky und Muller Inkompatibilitäten der beteiligten Genome zugrunde (Dobzhansky 1936; Muller 1942), die im Folgenden als DMI bezeichnet wird (Dobzhansky-Muller-Inkompatibilität). Diese Inkompatibilitäten beruhen auf der divergierenden Entwicklung zweier genetisch isolierter Populationen. Durch genetische Drift können Veränderungen auftreten, die interagierende Faktoren betreffen. Eine gerichtete Selektion verhindert aber, dass Veränderungen innerhalb einer Population zu gestörten Interaktionen der beteiligten Faktoren führen. So können Kombinationen verschiedener Allele von Genen interagierender Faktoren entstehen, die für eine Population spezifisch sind. In Kombination mit nicht koevolutionär adaptierten Allelen anderer Populationen kann

eine solche Interaktion in Hybriden inkompatibel sein. Sich daraus ergebende negative epistatische Effekte bilden die Grundlage für postzygotische Isolation (Orr 1995). Postzygotische Isolation ist wiederum eine Grundlage für Speziationsprozesse (Coyne und Orr 1998; Orr und Presgraves 2000).

Für die hauptsächlich im Fokus für DMI stehenden nukleären Loci, wurden bereits verschiedene Gene identifiziert (Wittbrodt *et al.* 1989; Ting *et al.* 1998; Presgraves *et al.* 2003) (Barbash *et al.* 2003). Es können jedoch auch organelläre Loci involviert sein (Grun 1976; Kirk und Tilney-Bassett 1978; Levin 2002). Kern-Organellen-Inkompatibilität kann also als Spezialfall der DMI angesehen werden und somit ebenso Auswirkung auf Speziationsprozesse haben (Schmitz-Linneweber *et al.* 2003).

4.4.1 RNA Edierung ist ein Faktor für Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität

Die Kombination des *A. belladonna* Kerngenoms mit dem Plastidengenom aus *N. tabacum* ist inkompatibel und führt zu einem albinotischen Phänotyp. Mit RNA Edierung konnte zum ersten Mal ein molekularer Mechanismus hinter einer solchen Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität identifiziert werden. Die fehlende Edierungsaktivität im Kerngenom von *A. belladonna* führt dazu, dass eine artfremde Edierungsstelle in der [Ab(Nt)]-Cybride nicht prozessiert wird, was der Auslöser für eine gestörte Chloroplastenbiogenese ist. Die Variabilität der plastidären Genome bezüglich der Edierungsstellen und die damit teilweise einhergehende Koevolution der kernkodierten Faktoren führen in der Kombination der artfremden Allele in der cytoplasmatischen Hybride also, wie für DMI vorgeschlagen, zu einer nicht kompatiblen Kombination. Alle bisherigen Hinweise deuten eine proteinöse Natur der Edierungsfaktoren an (Miyamoto *et al.* 2002; Kotera *et al.* 2005). Somit handelt es sich in diesem Fall wahrscheinlich um eine gestörte Interaktion eines Proteinfaktors mit der entsprechenden mRNA.

Ob RNA Edierung auch in näheren Verwandtschaftskreisen Auswirkungen auf interkompartimentelle Inkompatibilität hat, kann durch die Bestimmung und den Vergleich von Editotypen innerhalb von Arten einer Gattung, oder innerhalb von Ökotypen einer Art abgeschätzt werden.

Unterschiede in den plastidären Editotypen und damit potentielle Auslöser für Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität finden sich tatsächlich bereits innerhalb einer Gattung. In den hier untersuchten *Nicotiana* Arten wurde jeweils eine artspezifische Edierungsstelle identifiziert: für *N. tabacum* *ndhA*-358 und für *N. glutinosa* *ndhD*-293.

Die evolutionäre Dynamik von Edierungsstellen geht sogar soweit, dass Unterschiede zwischen Ökotypen von *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden konnten (Tillich *et al.* 2005). Kreuzungen der verschiedenen Ökotypen könnten Aufschluss geben, ob bereits durch den identifizierten Unterschied der Grundstein für eine Inkompatibilität zwischen Kerngenom und Plastom der verschiedenen Ökotypen gelegt ist.

Der für die Inkompatibilität in der [Ab(Nt)]-Cybride identifizierte Edierungsdefekt betrifft eine artspezifische Edierungsstelle für *N. tabacum*, *atpA*-264, deren zugehöriger Faktor im Kerngenom von *A. belladonna* nicht vorhanden ist. Ein Unterschied im *cis*-Element der Edierungsstelle *ndhG*-17, die in beiden Arten (*A. belladonna* und *N. tabacum*) vorhanden ist, führt jedoch im fremden Kernhintergrund in der [Ab(Nt)]-Cybride ebenso zu einem Edierungsdefekt. Dies verdeutlicht, dass *cis*-Elemente und Spezifitätsfaktoren koevolvieren. Somit können nicht nur artspezifische Edierungsstellen, sondern auch Edierungsstellen, für die Homologe in beiden beteiligten Arten vorhanden sind, zu Inkompatibilität führen.

Die Analyse von RNA Edierung als Auslöser für Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität muss also neben dem Vergleich der Editotypen auch Veränderungen in den *cis*-Elementen nicht-artspezifischer Edierungsstellen berücksichtigen.

4.4.2 Editotypenunterschiede müssen nicht zwangsläufig zu Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität führen

Die Editotypenanalyse von *N. tabacum* und *N. glutinosa* ergab jeweils eine artspezifische Edierungsstelle. Die Kompatibilität des *N. tabacum* Kerngenoms mit dem Plastom aus *N. glutinosa* ist durch die artfremde Edierungsstelle, *ndhD*-293, in diesem Fall jedoch nicht beeinträchtigt, da der Nukleus die Edierungskapazität für diese Stelle besitzt.

Obwohl RNA Edierung ein genereller Faktor für Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität sein kann, müssen also nicht alle Editotypenunterschiede zwangsläufig eine

Auswirkung haben. Wie das Beispiel der Edierungsstelle *ndhD*-293 zeigt, kann die Edierungsaktivität auch in Abwesenheit der Edierungsstelle erhalten sein (siehe 3.2.2). Ein Edierungsdefekt tritt in einem solchen Fall in einer interspezifischen Kombination von Kompartimenten also gar nicht auf. Der Vergleich von Editotypen kann also nur Hinweise auf mögliche Inkompatibilitäten liefern. Der Beweis muss immer experimentell durch einen Transfer der entsprechenden Edierungsstelle in den jeweiligen Kernhintergrund erfolgen. Wie sich die *N. tabacum* spezifische Edierungsstelle *ndhA*-358 im Kernhintergrund von *N. glutinosa* verhält, konnte nicht geklärt werden, da ein dafür nötiger Transfer der Edierungsstelle nicht möglich war. Eine Aussage über die Kompatibilität bezüglich dieser Edierungsstelle kann somit nicht getroffen werden, sondern nur anhand anderer vorhandener Daten zu dieser Edierungsstelle abgeschätzt werden (siehe 3.2.2).

In der oben bereits beschriebenen reversen [Nt(Ab)]-Cybride kommt es in Folge eines Editotypenunterschieds zu einem Edierungsdefekt in *rpoB*-809 (Schmitz-Linneweber 2002). Dieser Edierungsdefekt könnte auf den ersten Blick eine Inkompatibilität zwischen den beiden involvierten Genomen vermuten lassen, da Defekte in *rpo*-Genen zu Albinismus führen können (Allison *et al.* 1996; De Santis-Maclossek *et al.* 1999). Die [Nt(Ab)]-Cybride wächst allerdings photoautotroph. Offensichtlich hat der Edierungsdefekt keinen negativen Effekt auf die Chloroplastendifferenzierung in dieser Cybride. Hier durchgeführte Untersuchungen der homologen Edierungsstelle in *Spinacia oleracea* zeigten, dass auch teilweise in natürlich vorkommenden Kerngenom-Plastom Kombinationen diese Edierungsstelle nicht ediert wird. Im Gegensatz zu bisherigen Ergebnissen in denen RNA Edierung von funktioneller Relevanz war (Bock *et al.* 1994; Zito *et al.* 1997; Sasaki, Y. *et al.* 2001; Kotera *et al.* 2005), zeigt sich, dass es auch hierfür Ausnahmen gibt. Im Zusammenspiel des *N. tabacum* Kerngenoms mit dem *A. belladonna* Plastidengenom wird offensichtlich die aus unediertem *rpoB* Transkript hergestellte Isoform dieser PEP-Untereinheit akzeptiert.

Ob unterschiedliche Editotypen zu einer interkompartimentellen Inkompatibilität führen, hängt also von der Edierungsfaktorausstattung des beteiligten Kerngenoms ab, die eben nicht immer dem Editotyp entspricht, und sie hängt von der funktionellen Relevanz einer von einem Edierungsdefekt betroffenen Edierungsstelle ab.

4.4.3 Sexuelle Inkompatibilität lässt sich nicht durch Editotypenunterschiede erklären

Die Genome, die in der hier untersuchten Cybride kombiniert sind, stammen von den sexuell inkompatiblen Arten *A. belladonna* und *N. tabacum*. Bei mit *N. tabacum* bestäubten *A. belladonna* Blüten erfolgt binnen drei bis vier Tagen eine Abszission. Die reziproke Kreuzung führt zwar nicht zu einer Abszission, jedoch entwickeln sich keine Samen. Eine interspezifische Kreuzung sollte zu einem hybriden Kerngenom führen, welches alle benötigten Faktoren für die Edierung sämtlicher Stellen bereitstellen sollte. Hybriden sind jedoch durch Kreuzungen von *A. belladonna* mit *N. tabacum* nicht zu erhalten. Diese Beobachtungen sind durch einen plastidären Edierungsdefekt mit angenommener rezessiver Ausprägung der Edierungsfaktoren nicht erklärbar. Auch die Eliminierung des Edierungsdefektes durch einen C-T Austausch an der Edierungsstelle *atpA-264* des *N. tabacum* Plastoms führte nicht zur Aufhebung der sexuellen Inkompatibilität in der *N. tabacum* ♀ x *A. belladonna* ♂ Kreuzung. Es müssen für die sexuelle Inkompatibilität also noch weitere Faktoren verantwortlich sein, die eventuell andere Interaktionen zwischen den beiden Nuklei oder dem Nukleus und Mitochondrien betreffen. Editotypenunterschiede sind also nur ein Faktor, der zur Abgrenzung verschiedener Arten voneinander beitragen kann.

4.4.4 RNA Edierung könnte in Kerngenom-Chondriom-Inkompatibilität involviert sein

Cybriden sind relativ häufig männlich steril, was oft auf cytoplasmatische Faktoren zurückgeführt wird und in Folge dessen als CMS (cytoplasmic male sterility) bezeichnet wird. Die hier hergestellten photoautotrophen [Ab(Nt:CTC)]-Cybriden zeigten unterschiedliche Ausprägungen bezüglich ihrer Fertilität. Da sich für alle Linien zeigte, dass ein (modifiziertes) *N. tabacum* Plastidengenom in diesen Cybriden unabhängig von ihrer Fertilität erhalten war, muss die bei vielen Linien auftretende männliche Sterilität andere Ursachen haben. Höchstwahrscheinlich sind diese im mitochondrialen Genom zu suchen (Kofer *et al.* 1991; Melchers *et al.* 1992; Conley und Hanson 1995), für das häufige Rekombinationen während Cybridisierungsprozessen beschrieben sind (Belliard *et al.* 1979; Hanson und Bentolila 2004).

CMS kann aber nicht nur auf einer Rekombination der mitochondrialen Genome beruhen, sondern auch auf Kern-Mitochondrien-Inkompatibilitäten zurückzuführen sein. Solche Inkompatibilitäten könnten, wie es für *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor* und *Zea mays* vermutet wurde, ihre Ursache in Edierungsdefekten haben (Iwabuchi *et al.* 1993; Howad *et al.* 1999; Gallagher *et al.* 2002). Die Anzahl an Edierungsstellen in Mitochondrien übersteigt die der plastidären um mehr als den Faktor zehn (Giege und Brennicke 1999) und erhöht somit die Wahrscheinlichkeit eines solchen Defektes um ein vielfaches. Plastidäre und mitochondrielle RNA Edierung in Pflanzen zeigen viele Übereinstimmungen (Maier *et al.* 1996; Tillich *et al.* 2006a). Das beschriebene Szenario für plastidäre RNA Edierung als Faktor für Kern-Organellen-Inkompatibilität trifft somit höchstwahrscheinlich auch auf mitochondrielle RNA Edierung zu. Die Folgen von mitochondriellen Defekten könnten allerdings noch gravierender sein, da sie oftmals sogar letal sind.

Kern-Organellen-Inkompatibilitäten können auf Defekte in der RNA Edierung zurückgeführt werden. Ob es sich bei plastidärer RNA Edierung im Fall der Kern-genom-Plastom-Inkompatibilität um einen generellen Faktor handelt, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Hierfür könnten beispielsweise Artbastarde der Gattung *Oenothera* dienen, in denen verschiedene Kerngenom-Plastom-Kombinationen bezüglich Edierungsdefekten untersucht werden könnten.

4.5 Ist plastidäre RNA Edierung überflüssig?

Covello und Gray (1993) erklärten die Entstehung eines Edierungssystems anhand genetischer Drift und, einmal etabliert, die Erhaltung dieses Systems als Folge einer Koevolution von Edierungsstelle und Edierungsaktivität. Dieser möglicherweise überflüssige Prozess, scheint sich somit in letzter Konsequenz in eigennütziger Form selbst zu erhalten.

Generell akzeptiert ist, dass plastidäre RNA Edierung essentiell für die Funktion des betroffenen Genproduktes sein kann, wie mehrere Beispiele – inklusive dieser Arbeit – beweisen (Bock *et al.* 1994; Hirose und Sugiura 1997; Zito *et al.* 1997; Sasaki, Y. *et al.* 2001; Kotera *et al.* 2005). In dieser Hinsicht kann RNA Edierung also nicht als überflüssig betrachtet werden.

Vorstellbar wäre aber auch eine regulatorische Rolle von RNA Edierung in Plastiden. Die Genexpression könnte beispielsweise quantitativ durch eine differentielle Herstellung von Start-Codons durch RNA Edierung beeinflusst werden. In Tabak wird z.B. in *ndhD* das kanonische ATG Start-Codon durch Edierung aus einem auf DNA-Ebene kodierten ACG hergestellt. *In vitro* scheint nur die edierte Form translatiert zu werden (Hirose und Sugiura 1997). *In vivo* Experimente widersprechen dem jedoch. Auch die nicht edierte Form konnte assoziiert mit Ribosomen vorgefunden werden (Zanduetta-Criado und Bock 2004).

Eine weitere Möglichkeit läge in der qualitativen Regulation durch Herstellung zweier Proteinisoformen, wie dies für andere Edierungssysteme bereits bekannt ist (Powell *et al.* 1987). In photosynthetisch aktivem und nicht-aktiven Gewebe ist differentielle Edierung bekannt. Dabei überwiegt in grünem Gewebe der Anteil an ediertem Transkript (Karcher und Bock 2002). Dies könnte aber allein an einer generell niedrigeren Prozessierungsrate für plastidäre Transkripte in nicht-photosynthetisch aktivem Gewebe liegen. Für *petD* ist beispielsweise in Spinat ein geringeres Verhältnis von gespleißten zu ungespleißten Transkripten in Wurzelgewebe, verglichen mit Blattgewebe, beschrieben (Deng und Gruissem 1988). Ein Nachweis für verschiedene funktionelle Proteinisoformen in Plastiden, die auf ediertes und nicht-ediertes Transkript zurückgehen, wurde bisher nicht erbracht. Eine regulatorische Rolle von RNA Edierung in der plastidären Genexpression bleibt somit fraglich.

Außerdem ist für organelläre RNA Edierung in Pflanzen eine hohe Fluktuation für Edierungsstellen beschrieben (C in DNA, Edierung zu U gegen T in DNA, Shields und Wolfe 1997). Das bedeutet, dass in einer Art eine bestimmte Aminosäure bereits in der DNA kodiert ist, während in einer anderen (nah verwandten) Art die Kodierung für die entsprechende Aminosäure an der homologen Codonposition erst auf mRNA-Ebene durch Edierung hergestellt wird. Diese hohe Fluktuation spiegelt sich in den unterschiedlichen Editotypen bereits innerhalb naher Verwandtschaftskreise wider (Freyer *et al.* 1997; Sasaki, T. *et al.* 2003; Tillich *et al.* 2005). Wäre der Prozess der Edierung selbst essentiell, müsste man eine höhere Konservierung der Edierungsstellen erwarten (vgl.: Tillich *et al.* 2006a). Zumindest sollten sich in nah verwandten Arten essentielle Regulationsmechanismen nicht unterscheiden. Die hohe Fluktuation, also das schnelle Entstehen und der schnelle Verlust von Edierungs-

stellen, muss somit als weiteres Argument gegen eine regulatorische Aufgabe von plastidärer RNA Edierung gewertet werden.

Eine umfangreiche Analyse der Evolution von Edierungsstellen führte zu der Annahme, dass das plastidäre Edierungssystem in Landpflanzen monophyletischen Ursprungs ist (Tillich *et al.* 2006a). Ausgehend von einer hohen Anzahl an Edierungsstellen in ursprünglichen Taxa erfolgt ein sukzessiver Verlust dieser (C-T-Mutationen) an unabhängigen Positionen, was zu den artspezifischen Editotypen in Samenpflanzen führt. Interessanterweise scheinen Edierungsstellen hauptsächlich an Positionen mit der geringsten C-T Transitionsrate zu verbleiben. Somit könnte sich ein vergleichsweise komplexes Edierungssystem allein zur Reparatur von Punktmutationen auf RNA-Ebene erklären, die jedoch ebenso direkt in der DNA erfolgen kann (Tillich *et al.* 2006a).

Die Entfernung der Edierungsstelle in *atpA*-264 in den CAT-Linien (CCC zu CTC) hat tatsächlich keinen Einfluss auf die Entwicklung der Pflanzen, obwohl die entsprechende Aminosäureposition essentiell für die Chloroplastendifferenzierung ist. Selbst unter Stressbedingungen ist kein Unterschied zum Wildtyp zu erkennen. Dies ist ein Beweis, dass tatsächlich ein T auf DNA-Ebene in einer Art, die das entsprechende Codon normalerweise durch Edierung herstellt, keinerlei Einfluss auf die Chloroplasten- oder Pflanzenentwicklung hat.

Alle vorhandenen Daten sprechen also tendenziell gegen eine regulatorische Aufgabe von plastidärer RNA Edierung. Somit scheint die einzige Aufgabe tatsächlich in der Herstellung der Kodierung für konservierte Aminosäuren an bestimmten Positionen auf mRNA-Ebene zu liegen. Bisher gibt es jedoch keinen Hinweis, dass diese Information nicht bereits in der DNA kodiert sein kann. Das Gegenteil ist der Fall. Somit könnte RNA Edierung in Plastiden tatsächlich als überflüssig angesehen werden. Solange jedoch Edierungsfaktoren, z.B. aufgrund einer weiteren Funktion, vorhanden sind, besteht auch weiterhin die Möglichkeit der (Wieder-)Entstehung von Edierungsstellen in Form einer T-C Mutation und damit der Erhalt dieses Edierungssystems, wie von Covello und Gray 1993 vorgeschlagen.

5. Zusammenfassung

In pflanzlichen Zellen zeugen drei genetische Kompartimente von der endosymbiotischen Entstehung der Eukaryoten aus ehemals autonomen Organismen. Die Genome dieser Kompartimente, das Mitochondriengenom (Chondriom) und das Plastidengenom (Plastom), interagieren dabei auf verschiedenen Ebenen. Diese Interaktion muss koordiniert und streng reguliert ablaufen, um ein Funktionieren des Gesamtsystems zu gewährleisten. So bilden die Subgenome eine evolutive Einheit. Deutlich wird diese Koevolution der Subgenome wenn beispielsweise das Kerngenom einer Art mit dem Plastidengenom einer anderen Art kombiniert wird. Dies kann zu aberranten Phänotypen führen, ein Phänomen, das als Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität bezeichnet wird. Molekulare Mechanismen hinter diesem weit verbreiteten und seit über 70 Jahren bekannten Phänomen waren bislang jedoch nicht identifiziert worden.

Die Kombination des nukleären Genoms von *Atropa belladonna* [Ab] mit dem Plastidengenom von *Nicotiana tabacum* [(Nt)] führt zu einem albinotischen Phänotyp. Mit Hilfe von direkten und revers genetischen Ansätzen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Albinismus der [Ab(Nt)]-Cybride allein auf einem Defekt in der Prozessierung einer *N. tabacum* spezifischen Edierungsstelle beruht. Dabei handelt es sich um eine Edierungsstelle im Transkript für die α -Untereinheit der plastidären F_0F_1 -ATPase, *atpA*. Während in *N. tabacum* das CCC Prolincodon an Codonposition 264 in *atpA* durch Edierung in ein CUC Leucincodon überführt wird, ist das Leucincodon in *A. belladonna* bereits genomisch kodiert. In der Kombination des *A. belladonna* Kerngenoms mit dem Plastidengenom von *N. tabacum* verbleibt das C unedierte. In Folge der Abwesenheit der Edierungsstelle im Plastidengenom von *A. belladonna* (T auf DNA) ist offensichtlich kein funktionelles Allel für den nukleär kodierten spezifischen Edierungsfaktor vorhanden.

Neben weiteren, bereits bekannten Edierungsdefekten an *N. tabacum* spezifischen Edierungsstellen in der [Ab(Nt)]-Cybride konnte auch ein Edierungsdefekt an einer Edierungsstelle identifiziert werden, die in beiden Arten vorhanden ist. In Codon 17 von *ndhG* findet Edierung sowohl in *A. belladonna* als auch in *N. tabacum* statt. In der [Ab(Nt)]-Cybride verbleibt diese Stelle jedoch unedierte. Der Grund dieses Defekts liegt wahrscheinlich in einem Unterschied in der Erkennungssequenz der Edierungs-

stelle zwischen den beiden Arten. Auch wenn dieser Edierungsdefekt in *ndhG* nur eine untergeordnete Rolle bezüglich der phänotypischen Ausprägung der [Ab(Nt)]-Cybride spielt, zeigte sich, dass nukleär kodierte Edierungsfaktoren und plastidäre Edierungsstellen koevolvieren.

Auch innerhalb näherer Verwandtschaftsgrade konnten Unterschiede in der Verteilung von Edierungsstellen in den Plastomen von zwei Arten der Gattung *Nicotiana* identifiziert werden. *N. tabacum* und *N. glutinosa* besitzen jeweils eine artspezifische Edierungsstelle. RNA Edierung könnte also möglicherweise ein genereller Faktor für Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität sein.

Überraschenderweise zeigte die Analyse der *N. glutinosa* spezifischen Edierungsstelle im *N. tabacum* Kernhintergrund, dass eine artfremde Edierungsstelle prozessiert wird. Dies wird als heterologe Edierung bezeichnet und konnte mittlerweile für mehrere Edierungsstellen gezeigt werden. Offensichtlich ist die Koevolution von plastidärer Edierungsstelle und nukleär kodiertem Edierungsfaktor nicht in allen Fällen so strikt wie zunächst angenommen wurde. Edierungsfaktoren scheinen also zum Teil auch in Abwesenheit der Edierungsstelle (T auf DNA) evolutionär stabil zu sein.

Wie der Fall der [Ab(Nt)]-Cybride zeigt, kann RNA Edierung eine wesentliche Rolle in der Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität spielen. In diesem Fall ist ein Edierungsdefekt der Auslöser für den albinotischen Phänotyp. RNA Edierungsdefekte müssen jedoch nicht zwangsläufig aufgrund artspezifischer Muster plastidärer Edierungsstellen auftreten. Heterologe Edierung findet weitaus häufiger statt, als bisher angenommen. Bei einem interspezifischen Austausch von Organellen muss also im Einzelfall untersucht werden, ob Edierungsdefekte auftreten und wie schwerwiegend ein solcher Defekt gegebenenfalls ist.

6. Literaturverzeichnis

- Ahlert D., Ruf S. und Bock R., 2003. Plastid protein synthesis is required for plant development in tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15730-15735.
- Allen J. F., 1993. Control of gene expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes. *J Theor Biol* 165, 609-631.
- Allen J. F., 2003. The function of genomes in bioenergetic organelles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358, 19-37; discussion 37-18.
- Allison L. A., 2000. The role of sigma factors in plastid transcription. *Biochimie* 82, 537-548.
- Allison L. A., Simon L. D. und Maliga P., 1996. Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO J* 15, 2802-2809.
- ArabidopsisGenomeInitiative, 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815.
- Arisumi T., 1985. Rescuing abortive *Impatiens* hybrid through aseptic culture of ovules. *J Am Soc Hort Sci* 110, 273-276.
- Arnon D. I., 1949. Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiol* 24, 1-15.
- Aro E. M., Virgin I. und Andersson B., 1993. Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta* 1143, 113-134.
- Arthur T. M., Anthony L. C. und Burgess R. R., 2000. Mutational analysis of beta' 260-309, a sigma 70 binding site located on *Escherichia coli* core RNA polymerase. *J Biol Chem* 275, 23113-23119.
- Arthur T. M. und Burgess R. R., 1998. Localization of a sigma70 binding site on the N terminus of the *Escherichia coli* RNA polymerase beta' subunit. *J Biol Chem* 273, 31381-31387.
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. und Struhl K., 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*. (New York, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience).
- Avni A., Anderson J. D., Holland N., Rochaix J. D., Gromet-Elhanan Z. und Edelman M., 1992. Tentoxin sensitivity of chloroplasts determined by codon 83 of beta subunit of proton-ATPase. *Science* 257, 1245-1247.
- Barbash D. A., Siino D. F., Tarone A. M. und Roote J., 2003. A rapidly evolving MYB-related protein causes species isolation in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5302-5307.
- Barber J. und Andersson B., 1992. Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem Sci* 17, 61-66.
- Barkan A., 1988. Proteins encoded by a complex chloroplast transcription unit are each translated from both monocistronic and polycistronic mRNAs. *EMBO J* 7, 2637-2644.
- Barkan A. und Goldschmidt-Clermont M., 2000. Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression. *Biochimie* 82, 559-572.
- Barkan A., Walker M., Nolasco M. und Johnson D., 1994. A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms. *EMBO J* 13, 3170-3181.

- Bauer J., Hiltbrunner A., Weibel P., Vidi P. A., Alvarez-Huerta M., Smith M. D., Schnell D. J. und Kessler F., 2002. Essential role of the G-domain in targeting of the protein import receptor atToc159 to the chloroplast outer membrane. *J Cell Biol* 159, 845-854.
- Belliard G., Pelletier G., Vedel F. und Quetier F., 1978. Morphological characteristics and chloroplast NA distribution in different cytoplasmic parasexual hybrids of *Nicotiana tabacum*. *Mol Gen Genet* 165, 231-237.
- Belliard G., Vedel F. und Pelletier G., 1979. Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion. *Nature* 281, 401-403.
- Bendich A. J., 2004. Circular chloroplast chromosomes: the grand illusion. *Plant Cell* 16, 1661-1666.
- Benne R., Van den Burg J., Brakenhoff J. P., Sloof P., Van Boom J. H. und Tromp M. C., 1986. Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* 46, 819-826.
- Birnboim H. C. und Doly J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Blier P. U., Dufresne F. und Burton R. S., 2001. Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. *Trends Genet* 17, 400-406.
- Block M. D., Botterman J., Vandewiele M., Dockx J., Thoen C., Gossele V., Movva N. R., Thompson C., Montagu M. V. und Leemans J., 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J* 6, 2513-2518.
- Blum B., Bakalara N. und Simpson L., 1990. A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. *Cell* 60, 189-198.
- Blum H., Beier H. und Gross H., 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- Bock R., Hagemann R., Kossel H. und Kudla J., 1993. Tissue- and stage-specific modulation of RNA editing of the *psbF* and *psbL* transcript from spinach plastids - a new regulatory mechanism? *Mol Gen Genet* 240, 238-244.
- Bock R., Hermann M. und Kössel H., 1996. *In vivo* dissection of *cis*-acting determinants for plastid RNA editing. *EMBO J* 15, 5052-5059.
- Bock R. und Koop H. U., 1997. Extraplasmidic site-specific factors mediate RNA editing in chloroplasts. *EMBO J* 16, 3282-3288.
- Bock R., Kössel H. und Maliga P., 1994. Introduction of a heterologous editing site into the tobacco plastid genome: the lack of RNA editing leads to a mutant phenotype. *EMBO J* 13, 4623-4628.
- Bock R. und Maliga P., 1995. *In vivo* testing of a tobacco plastid DNA segment for guide RNA function in *psbL* editing. *Mol Gen Genet* 247, 439-443.
- Bonnett H. T., Djurberg I., Fajardo M. und Glimelius K., 1993. A mutation causing variegation and abnormal development in tobacco is associated with an altered mitochondrial DNA. *Plant J* 3, 519-525.
- Brown J. R., 2003. Ancient horizontal gene transfer. *Nat Rev Genet* 4, 121-132.
- Bülow S. und Link G., 1988. Sigma-like activity from mustard (*Sinapis alba* L.) chloroplasts conferring DNA-binding and transcription specificity to *E. coli* core RNA polymerase. *Plant Mol Biol* 10, 349 - 357.

- Burrows P. A., Sazanov L. A., Svab Z., Maliga P. und Nixon P. J., 1998. Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. *EMBO J* 17, 868-876.
- Butterfield N. J., 2000. *Bangiomorpha pubescens* n. gen., n. sp.: implications for the evolution of sex, multicellularity and the Mesoproterozoic/Neoproterozoic radiation of eukaryotes. *Paleobiology* 26, 386-404.
- Casano L. M., Martin M. und Sabater B., 2001. Hydrogen peroxide mediates the induction of chloroplastic Ndh complex under photooxidative stress in barley. *Plant Physiol* 125, 1450-1458.
- Chateigner-Boutin A. L. und Hanson M. R., 2002. Cross-competition in transgenic chloroplasts expressing single editing sites reveals shared *cis* elements. *Mol Cell Biol* 22, 8448-8456.
- Chateigner-Boutin A. L. und Hanson M. R., 2003. Developmental co-variation of RNA editing extent of plastid editing sites exhibiting similar *cis*-elements. *Nucleic Acids Res* 31, 2586-2594.
- Chaudhuri S., Carrer H. und Maliga P., 1995. Site-specific factor involved in the editing of the *psbL* mRNA in tobacco plastids. *EMBO J* 14, 2951-2957.
- Chaudhuri S. und Maliga P., 1996. Sequences directing C to U editing of the plastid *psbL* mRNA are located within a 22 nucleotide segment spanning the editing site. *EMBO J* 15, 5958-5964.
- Choquet Y., Stern D. B., Wostrikoff K., Kuras R., Girard-Bascou J. und Wollman F. A., 1998. Translation of cytochrome f is autoregulated through the 5' untranslated region of *petA* mRNA in *Chlamydomonas* chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4380-4385.
- Choquet Y. und Vallon O., 2000. Synthesis, assembly and degradation of thylakoid membrane proteins. *Biochimie* 82, 615-634.
- Clarkson J. J., Knapp S., Garcia V. F., Olmstead R. G., Leitch A. R. und Chase M. W., 2004. Phylogenetic relationships in *Nicotiana* (Solanaceae) inferred from multiple plastid DNA regions. *Mol Phylogenet Evol* 33, 75-90.
- Clausen R. E. und Goodspeed T. H., 1925. Interspecific hybridization in *Nicotiana*. II. A tetraploid *Glutinosa-Tabacum* hybrid, an experimental verification of Winge's hypothesis. *Genetics* 10, 278-284.
- Clausen R. E. und Goodspeed T. H., 1928. Interspecific hybridization in *Nicotiana*. VIII. The *Sylvestris-Tomentosiformis-Tabacum* hybrid triangle and its bearing on the origin of *Tabacum*. *Univ Calif Publ Bot* 11, 245-256.
- Conley C. A. und Hanson M. R., 1995. How do alterations in plant mitochondrial genomes disrupt pollen development? *J Bioenerg Biomembr* 27, 447-457.
- Corneille S., Lutz K. und Maliga P., 2000. Conservation of RNA editing between rice and maize plastids: are most editing events dispensable? *Mol Gen Genet* 264, 419-424.
- Covello P. S. und Gray M. W., 1989. RNA editing in plant mitochondria. *Nature* 341, 662-666.
- Covello P. S. und Gray M. W., 1993. On the evolution of RNA editing. *Trends Genet* 9, 265-268.
- Coyne J. A. und Orr H. A., 1998. The evolutionary genetics of speciation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353, 287-305.
- Cummings M. P., King L. M. und Kellogg E. A., 1994. Slipped-strand mispairing in a plastid gene: *rpoC2* in grasses (Poaceae). *Mol Biol Evol* 11, 1-8.
- dal Bosco C. D., Lezhneva L., Biehl A., Leister D., Strotmann H., Wanner G. und Meurer J., 2004. Inactivation of the chloroplast ATP synthase gamma subunit

- results in high non-photochemical fluorescence quenching and altered nuclear gene expression in *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem 279, 1060-1069.
- De Santis-Maclossek G., Kofer W., Bock A., Schoch S., Maier R. M., Wanner G., Rudiger W., Koop H. U. und Herrmann R. G., 1999. Targeted disruption of the plastid RNA polymerase genes *rpoA*, *B* and *C1*: molecular biology, biochemistry and ultrastructure. Plant J 18, 477-489.
- Deblaere R., Bytebier B., De Greve H., Deboeck F., Schell J., Van Montagu M. und Leemans J., 1985. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. Nucleic Acids Res 13, 4777-4788.
- Del Campo E. M., Sabater B. und Martin M., 2000. Transcripts of the *ndhH-D* operon of barley plastids: possible role of unedited site III in splicing of the *ndhA* intron. Nucleic Acids Res 28, 1092-1098.
- Deng X. W. und Gruissem W., 1988. Constitutive transcription and regulation of gene expression in non-photosynthetic plastids of higher plants. EMBO J 7, 3301-3308.
- Dobzhansky T., 1936. Studies of hybrid sterility. II. Localization of sterility factors in *Drosophila pseudoobscura* hybrids. Genetics 21, 113-135.
- Drescher A., Hupfer H., Nickel C., Albertazzi F., Hohmann U., Herrmann R. G. und Maier R. M., 2002. C-to-U conversion in the intercistronic *ndhH/ndhG* RNA of plastids from monocot plants: conventional editing in an unconventional small reading frame? Mol Genet Genomics 267, 262-269.
- Edmands S. und Burton R., 1999. Cytochrome c oxidase activity in intrapopulation hybrids of marine copepod: A test for nuclear-cytoplasmic coadaptation. Evolution Int J Org Evolution 53, 9131-9135.
- Emanuel C., von Groll U., Muller M., Borner T. und Weihe A., 2006. Development- and tissue-specific expression of the *RpoT* gene family of *Arabidopsis* encoding mitochondrial and plastid RNA polymerases. Planta 223, 998-1009.
- Emanuel C., Weihe A., Graner A., Hess W. R. und Borner T., 2004. Chloroplast development affects expression of phage-type RNA polymerases in barley leaves. Plant J 38, 460-472.
- Favory J. J., Kobayshi M., Tanaka K., Peltier G., Kreis M., Valay J. G. und Lerbs-Mache S., 2005. Specific function of a plastid sigma factor for *ndhF* gene transcription. Nucleic Acids Res 33, 5991-5999.
- Freyer R., Hoch B., Neckermann K., Maier R. M. und Kossel H., 1993. RNA editing in maize chloroplasts is a processing step independent of splicing and cleavage to monocistronic mRNAs. Plant J 4, 621-629.
- Freyer R., Kiefer-Meyer M. C. und Kossel H., 1997. Occurrence of plastid RNA editing in all major lineages of land plants. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 6285-6290.
- Fuchs M., Maier R. M. und Zeltz P., 2001. RNA editing in higher plant plastids: oligoribonucleotide SSCP analysis allows the proof of base conversion directly at the RNA level. Curr Genet 39, 384-387.
- Funk H. T., Poltnigg P., Schmitz-Linneweber C. und Tillich M., 2004. Transcript polishing in higher plant plastids by RNA editing. Endocytobiosis and Cell Res 15, 491-503.
- Galitski T., Saldanha A. J., Styles C. A., Lander E. S. und Fink G. R., 1999. Ploidy regulation of gene expression. Science 285, 251-254.
- Gallagher L. J., Betz S. K. und Chase C. D., 2002. Mitochondrial RNA editing truncates a chimeric open reading frame associated with S male-sterility in maize. Curr Genet 42, 179-184.

- Gastony G. J., 1991. Gene silencing in a polyploid homosporous fern: paleopolyploidy revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1602-1605.
- Giege P. und Brennicke A., 1999. RNA editing in *Arabidopsis* mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15324-15329.
- Gleba Y., Momot V. P., Cherep N. und Skarzhynskaya M. V., 1982. Intertribal hybrid cell lines of *Atropa belladonna* + *Nicotiana chinensis* obtained by cloning individual protoplast fusion products. *Theor Appl Genet* 62, 75-79.
- Gleba Y. und Sytnik K., 1984. Protoplast fusion: Genetic engineering in higher plants. 8, Schoerman R., ed. (Berlin, Springer).
- Goldschmidt-Clermont M., 1991. Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker of site-directed transformation of chlamydomonas. *Nucleic Acids Res* 19, 4083-4089.
- Gott J. M. und Emeson R. B., 2000. Functions and mechanisms of RNA editing. *Annu Rev Genet* 34, 499-531.
- Groth G., 2002. Structure of spinach chloroplast F1-ATPase complexed with the phytopathogenic inhibitor tentoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3464-3468.
- Grun P., 1976. Cytoplasmic genetics and evolution. (Columbia and Princeton).
- Gualberto J. M., Lamattina L., Bonnard G., Weil J. H. und Grienemberger J. M., 1989. RNA editing in wheat mitochondria results in the conservation of protein sequences. *Nature* 341, 660-662.
- Guo M., Davis D. und Birchler J. A., 1996. Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series. *Genetics* 142, 1349-1355.
- Hagemann R., 1982. Induction of plastome mutations by nitrosourea compounds., Edelman M., Hallick R. B., and Chua N. H., eds. (Amsterdam, Elsevier).
- Hajdukiewicz P. T., Allison L. A. und Maliga P., 1997. The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *EMBO J* 16, 4041-4048.
- Halloin J. M., De Zoeten G. A. und Walker J. C., 1970. The effects of tentoxin on chlorophyll synthesis and plastid structure in cucumber and cabbage. *Plant Physiol* 45, 310-314.
- Halter C. P., Peeters N. M. und Hanson M. R., 2004. RNA editing in ribosome-less plastids of *iojap* maize. *Curr Genet* 45, 331-337.
- Han C.-D., Patrie W., Polacco M. und Coe E. H., 1993. Aberrations in plastid transcripts and deficiency of plastid DNA in striped and albino mutants in maize. *Planta* 191, 552-563.
- Hanson M. R. und Bentolila S., 2004. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell* 16 Suppl, S154-169.
- Hedtke B., Borner T. und Weihe A., 1997. Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Science* 277, 809-811.
- Hedtke B., Borner T. und Weihe A., 2000. One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Rep* 1, 435-440.
- Hedtke B., Meixner M., Gillandt S., Richter E., Borner T. und Weihe A., 1999a. Green fluorescent protein as a marker to investigate targeting of organellar RNA polymerases of higher plants *in vivo*. *Plant J* 17, 557-561.
- Hedtke B., Wagner I., Borner T. und Hess W. R., 1999b. Inter-organellar crosstalk in higher plants: impaired chloroplast development affects mitochondrial gene and transcript levels. *Plant J* 19, 635-643.
- Hermann M. und Bock R., 1999. Transfer of plastid RNA-editing activity to novel sites suggests a critical role for spacing in editing-site recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4856-4861.

- Herrmann R. G., 1996. Photosynthesis research: aspects and perspectives., Salter H. A., and Barber J., eds. (Oxford, IRL Press).
- Herrmann R. G., 1997. Eukaryotism, towards a new interpretation. Schenk H. E. A., Herrmann R. G., Jeon K. W., Müller N. E., and Schwemmler W., eds. (Heidelberg and New York, Springer).
- Herrmann R. G., Maier R. M. und Schmitz-Linneweber C., 2003. Eukaryotic genome evolution: rearrangement and coevolution of compartmentalized genetic information. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358, 87-97.
- Hess W. R. und Börner T., 1999. Organellar RNA polymerases of higher plants. *Int Rev Cytol* 190, 1-59.
- Hiesel R., Wissinger B., Schuster W. und Brennicke A., 1989. RNA editing in plant mitochondria. *Science* 246, 1632-1634.
- Hirose T., Fan H., Suzuki J. Y., Wakasugi T., Tsudzuki T., Kossel H. und Sugiura M., 1996. Occurrence of silent RNA editing in chloroplasts: its species specificity and the influence of environmental and developmental conditions. *Plant Mol Biol* 30, 667-672.
- Hirose T., Kusumegi T., Tsudzuki T. und Sugiura M., 1999. RNA editing sites in tobacco chloroplast transcripts: editing as a possible regulator of chloroplast RNA polymerase activity. *Mol Gen Genet* 262, 462-467.
- Hirose T. und Sugiura M., 1997. Both RNA editing and RNA cleavage are required for translation of tobacco chloroplast *ndhD* mRNA: a possible regulatory mechanism for the expression of a chloroplast operon consisting of functionally unrelated genes. *EMBO J* 16, 6804-6811.
- Hirose T. und Sugiura M., 2001. Involvement of a site-specific *trans*-acting factor and a common RNA-binding protein in the editing of chloroplast mRNAs: development of a chloroplast *in vitro* RNA editing system. *EMBO J* 20, 1144-1152.
- Hirose T., Wakasugi T., Sugiura M. und Kossel H., 1994. RNA editing of tobacco *petB* mRNAs occurs both in chloroplasts and non-photosynthetic proplastids. *Plant Mol Biol* 26, 509-513.
- Hoch B., Maier R. M., Appel K., Igloi G. L. und Kossel H., 1991. Editing of a chloroplast mRNA by creation of an initiation codon. *Nature* 353, 178-180.
- Holland N., Belkind A., Holland D., Pick U. und Edelman M., 1998. Stress-responsive accumulation of plastid chaperonin 60 during seedling development. *Plant J* 13, 311-316.
- Holland N., Evron Y., Jansen M., Edelman M. und Pick U., 1997. Involvement of Thylakoid Overenergization in Tentoxin-Induced Chlorosis in *Nicotiana* spp. *Plant Physiol* 114, 887-892.
- Holmes F. O., 1938. Inheritance of resistance to tobacco-mosaic disease in tobacco. *Phytopathology* 28, 553-561.
- Horvath E. M., Peter S. O., Joet T., Rumeau D., Cournac L., Horvath G. V., Kavanagh T. A., Schafer C., Peltier G. und Medgyesy P., 2000. Targeted inactivation of the plastid *ndhB* gene in tobacco results in an enhanced sensitivity of photosynthesis to moderate stomatal closure. *Plant Physiol* 123, 1337-1350.
- Howad W., Tang H. V., Pring D. R. und Kempken F., 1999. Nuclear genes from Tx CMS maintainer lines are unable to maintain *atp6* RNA editing in any anther cell-type in the *Sorghum bicolor* A3 cytoplasm. *Curr Genet* 36, 62-68.
- Huang C. Y., Ayliffe M. A. und Timmis J. N., 2003. Direct measurement of the transfer rate of chloroplast DNA into the nucleus. *Nature* 422, 72-76.

- Igloi G. L. und Kössel H., 1992. The transcriptional apparatus of chloroplasts. *Crit Rev Plan Sci* 10, 525-558.
- Inada M., Sasaki T., Yukawa M., Tsudzuki T. und Sugiura M., 2004. A systematic search for RNA editing sites in pea chloroplasts: an editing event causes diversification from the evolutionarily conserved amino acid sequence. *Plant Cell Physiol* 45, 1615-1622.
- Iwabuchi M., Kyoizuka J. und Shimamoto K., 1993. Processing followed by complete editing of an altered mitochondrial *atp6* RNA restores fertility of cytoplasmic male sterile rice. *EMBO J* 12, 1437-1446.
- Jenkins B. D., Kulhanek D. J. und Barkan A., 1997. Nuclear mutations that block group II RNA splicing in maize chloroplasts reveal several intron classes with distinct requirements for splicing factors. *Plant Cell* 9, 283-296.
- Kanamaru K., Nagashima A., Fujiwara M., Shimada H., Shirano Y., Nakabayashi K., Shibata D., Tanaka K. und Takahashi H., 2001. An *Arabidopsis* sigma factor (SIG2)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 42, 1034-1043.
- Kaneko T., Sato S., Kotani H., Tanaka A., Asamizu E., Nakamura Y., Miyajima N., Hirose M., Sugiura M., Sasamoto S., *et al.*, 1996. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (supplement). *DNA Res* 3, 185-209.
- Karcher D. und Bock R., 2002. The amino acid sequence of a plastid protein is developmentally regulated by RNA editing. *J Biol Chem* 277, 5570-5574.
- Kenyon L. und Moraes C. T., 1997. Expanding the functional human mitochondrial DNA database by the establishment of primate xenomitochondrial hybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9131-9135.
- Kirk J. T. O. und Tilney-Bassett R. A. E., 1978. The plastids. Their chemistry, structure, growth and inheritance. 2nd edn (Amsterdam, Elsevier).
- Knapp S., Chase M. W. und Clarkson J. J., 2004. Nomenclature changes and a new sectional classification in *Nicotiana* (Solanaceae). *Taxon* 52, 73-82.
- Knox J. P. und Dodge A. D., 1985. Singlet oxygen and plants. *Phytochemistry* 24, 889-896.
- Kofer W., Glimelius K. und Bonnett H. T., 1991. Modifications of Mitochondrial DNA Cause Changes in Floral Development in Homeotic-like Mutants of Tobacco. *Plant Cell* 3, 759-769.
- Kofer W., Koop H. U., Wanner G. und Steinmüller K., 1998. Mutagenesis of the genes encoding subunits A, C, H, I, J and K of the plastid NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase in tobacco by polyethylene glycol-mediated plastome transformation. *Mol Gen Genet* 258, 166-173.
- Koop H. U., Steinmüller K., Wagner H., Rossler C., Eibl C. und Sacher L., 1996. Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation. *Planta* 199, 193-201.
- Kotera E., Tasaka M. und Shikanai T., 2005. A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature* 433, 326-330.
- Krause K., Maier R. M., Kofer W., Krupinska K. und Herrmann R. G., 2000. Disruption of plastid-encoded RNA polymerase genes in tobacco: expression of only a distinct set of genes is not based on selective transcription of the plastid chromosome. *Mol Gen Genet* 263, 1022-1030.
- Kudla J. und Bock R., 1999. RNA editing in an untranslated region of the *Ginkgo* chloroplast genome. *Gene* 234, 81-86.

- Kudla J., Igloi G. L., Metzlauff M., Hagemann R. und Kossel H., 1992. RNA editing in tobacco chloroplasts leads to the formation of a translatable *psbL* mRNA by a C to U substitution within the initiation codon. *EMBO J* 11, 1099-1103.
- Kugita M., Yamamoto Y., Fujikawa T., Matsumoto T. und Yoshinaga K., 2003. RNA editing in hornwort chloroplasts makes more than half the genes functional. *Nucleic Acids Res* 31, 2417-2423.
- Kuntz M., Camara B., Weil J. H. und Schantz R., 1992. The *psbL* gene from bell pepper (*Capsicum annuum*): plastid RNA editing also occurs in non-photosynthetic chromoplasts. *Plant Mol Biol* 20, 1185-1188.
- Kuras R. und Wollman F. A., 1994. The assembly of cytochrome b6/f complexes: an approach using genetic transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J* 13, 1019-1027.
- Kuroda H. und Maliga P., 2003. The plastid *clpP1* protease gene is essential for plant development. *Nature* 425, 86-89.
- Kushnir S., Babiychuk E., Bannikova M., Momot V., Komarnitsky I., Cherep N. und Gleba Y., 1991. Nucleo-cytoplasmic incompatibility in cybrid plants possessing an *Atropa* genome and a *Nicotiana* plastome. *Mol Gen Genet* 225, 225-230.
- Kushnir S., Schlumukow L. R., Pogrebnyak N. J., Berger S. und Gleba Y., 1987. Functional cybrid plants possessing a *Nicotiana* genome and an *Atropa* plastome. *Mol Gen Genet* 209, 159-163.
- Kushnir S., Schlumukow L. R., Pogrebnyak N. J. und Gleba Y., 1986. The cell-engineering synthesis of the cybrids, possessing the *Nicotiana tabacum* L. nucleus and *Atropa belladonna* L. plastids. *Proc Acad Sci USSR* 291, 1238-1240.
- Kyhse-Andersen J., 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10, 203-209.
- Laemmli U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Legen J., Kemp S., Krause K., Profanter B., Herrmann R. G. und Maier R. M., 2002. Comparative analysis of plastid transcription profiles of entire plastid chromosomes from tobacco attributed to wild-type and PEP-deficient transcription machineries. *Plant J* 31, 171-188.
- Leister D., 2003. Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet* 19, 47-56.
- Lerbs S., Bräutigam E. und Mache R., 1988. DNA-dependent RNA polymerase of spinach chloroplasts: Characterization of alpha-like and sigma-like polypeptides. *Mol Gen Genet* 211, 459 - 464.
- Lerbs-Mache S., 1993. The 110-kDa polypeptide of spinach plastid DNA-dependent RNA polymerase: single-subunit enzyme or catalytic core of multimeric enzyme complexes? *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5509-5513.
- Levin D., 2002. The cytoplasmic factor in plant speciation. *Systematic Botany* 28, 5-11.
- Liere K. und Maliga P., 1999. *In vitro* characterization of the tobacco *rpoB* promoter reveals a core sequence motif conserved between phage-type plastid and plant mitochondrial promoters. *EMBO J* 18, 249-257.
- Lim K. Y., Kovarik A., Matyasek R., Bezdek M., Lichtenstein C. P. und Leitch A. R., 2000. Gene conversion of ribosomal DNA in *Nicotiana tabacum* is associated with undermethylated, decondensed and probably active gene units. *Chromosoma* 109, 161-172.

- Liu B., Vega J. M. und Feldman M., 1998. Rapid genomic changes in newly synthesized amphiploids of *Triticum* and *Aegilops*. II. Changes in low-copy coding DNA sequences. *Genome* 41, 535-542.
- Lurin C., Andres C., Aubourg S., Bellaoui M., Bitton F., Bruyere C., Caboche M., Debast C., Gualberto J., Hoffmann B., *et al.*, 2004. Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 16, 2089-2103.
- Lutz K. A. und Maliga P., 2001. Lack of conservation of editing sites in mRNAs that encode subunits of the NAD(P)H dehydrogenase complex in plastids and mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *Curr Genet* 40, 214-219.
- Maier R. M., Hoch B., Zeltz P. und Kossel H., 1992a. Internal editing of the maize chloroplast *ndhA* transcript restores codons for conserved amino acids. *Plant Cell* 4, 609-616.
- Maier R. M., Neckermann K., Hoch B., Akhmedov N. B. und Kossel H., 1992b. Identification of editing positions in the *ndhB* transcript from maize chloroplasts reveals sequence similarities between editing sites of chloroplasts and plant mitochondria. *Nucleic Acids Res* 20, 6189-6194.
- Maier R. M., Neckermann K., Igloi G. L. und Kössel H., 1995. Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. *J Mol Biol* 251, 614-628.
- Maier R. M., Zeltz P., Kössel H., Bonnard G., Gualberto J. M. und Grienemberger J. M., 1996. RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts. *Plant Mol Biol* 32, 343-365.
- Maliga P., Sz-Breznovits A. und Marton L. J. F., 1975. Non-Mendelian streptomycin-resistant tobacco mutant with altered chloroplasts and mitochondria. *Nature* 255, 401-402.
- Margulis L. (1970). Origin of Eucaryotic Cells. In Yale University Press (New Haven).
- Martin W. und Herrmann R. G., 1998. Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? *Plant Physiol* 118, 9-17.
- Martin W., Rujan T., Richly E., Hansen A., Cornelsen S., Lins T., Leister D., Stoebe B., Hasegawa M. und Penny D., 2002. Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12246-12251.
- Martin W., Stoebe B., Goremykin V., Hapsmann S., Hasegawa M. und Kowallik K. V., 1998. Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* 393, 162-165.
- Martinez-Zapater J. M., Gil P., Capel J. und Somerville C. R., 1992. Mutations at the *Arabidopsis* CHM locus promote rearrangements of the mitochondrial genome. *Plant Cell* 4, 889-899.
- McCabe P. F., Timmons A. M. und Dix P. J., 1989. A simple procedure for the isolation of streptomycin resistant plants in Solanaceae. *Mol Gen Genet* 216, 132-137.
- McCormac D. J. und Barkan A., 1999. A nuclear gene in maize required for the translation of the chloroplast *atpB/E* mRNA. *Plant Cell* 11, 1709-1716.
- McFadden G. I., 1999. Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Curr Opin Plant Biol* 2, 513-519.
- Medgyesy P., 1994. Cybrids. Transfer of chloroplast traits through protoplast fusion between sexually incompatible Solanaceae species. 27, Bajaj Y. P. S., ed. (Berlin, Springer).

- Melchers G., Mohri Y., Watanabe K., Wakabayashi S. und Harada K., 1992. One-step generation of cytoplasmic male sterility by fusion of mitochondrial-inactivated tomato protoplasts with nuclear-inactivated *Solanum* protoplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6832-6836.
- Menczel L., Nagy F., Kiss Z. R. und Maliga P., 1981. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana knightiana*, correlation of resistance to *N. tabacum* plastids. *Theor Appl Genet* 59, 191-195.
- Menczel L., Nagy F., Kiss Z. R. und Maliga P., 1982. Effect of radiation dosage on efficiency of chloroplast transfer by protoplast fusion in *Nicotiana*. *Genetics* 100, 487-495.
- Mereschkowsky C., 1905. Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. 25., 593-604.
- Mereschkowsky C., 1910. Theorie der zwei Plasmaarten als Grundlage der Symbiogenese, einer neuen Lehre von der Entstehung der Organismen. *Biol Zentralblatt* 30.
- Metzlaff M., Pohlheim F., Börner T. und Hagemann R., 1982. Hybrid variegation in the genus *Pelargonium*. *Curr Genet* 5, 245-249.
- Minoletti C., Santolini J., Haraux F., Pothier J. und Andre F., 2002. Rebuilt 3D structure of the chloroplast f1 ATPase-tentoxin complex. *Proteins* 49, 302-320.
- Miyagi T., Kapoor S., Sugita M. und Sugiura M., 1998. Transcript analysis of the tobacco plastid operon *rps2/atpl/H/F/A* reveals the existence of a non-consensus type II (NCII) promoter upstream of the *atpl* coding sequence. *Mol Gen Genet* 257, 299-307.
- Miyamoto T., Obokata J. und Sugiura M., 2002. Recognition of RNA editing sites is directed by unique proteins in chloroplasts: biochemical identification of *cis*-acting elements and *trans*-acting factors involved in RNA editing in tobacco and pea chloroplasts. *Mol Cell Biol* 22, 6726-6734.
- Miyamoto T., Obokata J. und Sugiura M., 2004. A site-specific factor interacts directly with its cognate RNA editing site in chloroplast transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 48-52.
- Monde R. A., Schuster G. und Stern D. B., 2000. Processing and degradation of chloroplast mRNA. *Biochimie* 82, 573-582.
- Muller H. J., 1942. Isolating mechanisms, evolution and temperature. *Biol Symp* 6, 71-125.
- Murashige T. und Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15, 473-497.
- Newton K. J. und Coe E. H., 1986. Mitochondrial DNA changes in abnormal growth (nonchromosomal stripe) mutants of maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 7363-7366.
- Nivison H. T. und Hanson M. R., 1989. Identification of a mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in petunia. *Plant Cell* 1, 1121-1130.
- Niyogi K. K., 1999. Photoprotection Revisited: Genetic and Molecular Approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50, 333-359.
- Oda K., Yamato K., Ohta E., Nakamura Y., Takemura M., Nozato N., Akashi K., Kanegae T., Ogura Y., Kohchi T. und et al., 1992. Gene organization deduced from the complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* mitochondrial DNA. A primitive form of plant mitochondrial genome. *J Mol Biol* 223, 1-7.
- Ohyama K., 1996. Chloroplast and mitochondrial genomes from a liverwort, *Marchantia polymorpha*-gene organization and molecular evolution. *Biosci Biotechnol Biochem* 60, 16-24.

- Ohyama K., Fukuzawa H., Kohchi T., Shirai H., Sano T., Sano S., Umesono K., Shiki Y., Takeuchi M., Chang Z., *et al.*, 1986. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322, 572-574.
- Ohyama K., Oda K., Ohta E. und Takemura M., 1993. Gene organization and evolution of introns of a liverwort, *Marchantia polymorpha*, mitochondrial genome., Brennicke A., and Kück U., eds. (Verlag Chemie, Weinheim).
- Oldenburg D. J. und Bendich A. J., 2004. Most chloroplast DNA of maize seedlings in linear molecules with defined ends and branched forms. *J Mol Biol* 335, 953-970.
- Orr H. A., 1995. The Population Genetics of Speciation: The Evolution of Hybrid Incompatibilities. *Genetics* 139, 1805-1813.
- Orr H. A. und Presgraves D. C., 2000. Speciation by postzygotic isolation: forces, genes and molecules. *Bioessays* 22, 1085-1094.
- Palmer J. D., 1991. Plastid chromosomes: structure and evolution. In: Vasil, I. K., Bogorad, L. (Herausgeber). *Cell culture and somatic cell genetics in plants*, Vol 7A, The molecular biology of plastids Academic Press, San Diego, 5-53.
- Pandey K. K., Grant J. E. und Williams E. G., 1987. Interspecific hybridisation between *Trifolium repens* and *T. uniflorum*. *Aust J Bot* 35, 171-182.
- Pavlova P., Shimabukuro K., Hisabori T., Groth G., Lill H. und Bald D., 2004. Complete inhibition and partial Re-activation of single F1-ATPase molecules by tentoxin: new properties of the re-activated enzyme. *J Biol Chem* 279, 9685-9688.
- Pohlheim F., 1986. Hybrid variegation in crosses between *Pelargonium zonale* (L.) l'Herit. ex Ait. and *Pelargonium inquinans* (L.) l'Herit ex Ait.. *Plant Breed* 97, 93-96.
- Poltnigg P., 2002. Evolutionäre Fluktuation plastidärer Edierungsstellen und nukleärer Edierungsfaktoren innerhalb der Gattungen *Nicotiana* und *Oenothera*. Diplomarbeit, LMU, München.
- Powell L. M., Wallis S. C., Pease R. J., Edwards Y. H., Knott T. J. und Scott J., 1987. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell* 50, 831-840.
- Presgraves D. C., Balagopalan L., Abmayr S. M. und Orr H. A., 2003. Adaptive evolution drives divergence of a hybrid inviability gene between two species of *Drosophila*. *Nature* 423, 715-719.
- Przywara I., White D. W. R., Sanders P. M. und Maher D., 1989. Interspecific hybridization of *Trifolium repens* with *T. hybridum* using in ovulo embryo and embryo culture. *Ann Bot* 64, 613-624.
- Reed M. L. und Hanson M. R., 1997. A heterologous maize *rpoB* editing site is recognized by transgenic tobacco chloroplasts. *Mol Cell Biol* 17, 6948-6952.
- Reed M. L., Lyi S. M. und Hanson M. R., 2001. Edited transcripts compete with unedited mRNAs for *trans*-acting editing factors in higher plant chloroplasts. *Gene* 272, 165-171.
- Renner O., 1934. Die pflanzlichen Plastiden als selbstständige Elemente der genetischen Konstitution. *Ber Math-Phys Klasse Sächs Akad Wiss Leipzig* 86, 241-266.
- Rochaix J. D., 1997. Chloroplast reverse genetics: new insights into the function of plastid genes. *Trends Plant Sci* 2, 419-425.
- Rodermel S., 2001. Pathways of plastid-to-nucleus signaling. *Trends Plant Sci* 6, 471-478.

- Rodriguez-Ezpeleta N., Brinkmann H., Burey S. C., Roure B., Burger G., Löffelhardt W., Bohnert H. J., Philippe H. und Lang B. F., 2005. Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes. *Curr Biol* 15, 1325-1330.
- Ruf S., Zeltz P. und Kossel H., 1994. Complete RNA editing of unspliced and dicistronic transcripts of the intron-containing reading frame IRF170 from maize chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2295-2299.
- Rujan T. und Martin W., 2001. How many genes in *Arabidopsis* come from cyanobacteria? An estimate from 386 protein phylogenies. *Trends Genet* 17, 113-120.
- Sambrook J., Fritsch E. und Maniatis T., 1989. 2 edn (Cold Spring Harbor, New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanger F., Nicklen S. und Coulson A. R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Santolini J., Gomis J. M., Haraux F., Sigalat C. und Andre F., 1998. Study of the interactions between tentoxin and ATP-synthetase: kinetic and structural investigations. *EBEC Reports* 10, 55.
- Santolini J., Haraux F., Sigalat C., Moal G. und Andre F., 1999. Kinetic analysis of tentoxin binding to chloroplast F1-ATPase. A model for the overactivation process. *J Biol Chem* 274, 849-858.
- Sasaki T., Yukawa Y., Miyamoto T., Obokata J. und Sugiura M., 2003. Identification of RNA Editing Sites in Chloroplast Transcripts from the Maternal and Paternal Progenitors of Tobacco (*Nicotiana tabacum*): Comparative Analysis Shows the Involvement of Distinct *Trans*-Factors for *ndhB* Editing. *Mol Biol Evol* 20, 1028-1035.
- Sasaki T., Yukawa Y., Wakasugi T., Yamada K. und Sugiura M., 2006. A simple *in vitro* RNA editing assay for chloroplast transcripts using fluorescent dideoxynucleotides: distinct types of sequence elements required for editing of *ndh* transcripts. *Plant J*.
- Sasaki Y., Kozaki A., Ohmori A., Iguchi H. und Nagano Y., 2001. Chloroplast RNA editing required for functional acetyl-CoA carboxylase in plants. *J Biol Chem* 276, 3937-3940.
- Schimper A. F. W., 1893. Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Bot Zeitung* 41, 105-114, 121-131, 137-146, 153-162.
- Schmitz-Linneweber C., 2002. Genetische Determinanten von kompartimenteller Inkompatibilität in Genom/Plastom-Artbastarden. Dissertation, LMU, München.
- Schmitz-Linneweber C., Herrmann R. G. und Maier R. M., 2004. Evolutionary fluctuation of plastid RNA editing. *Endocytobiosis and Cell Res* 15, 246-255.
- Schmitz-Linneweber C., Regel R., Du T. G., Hupfer H., Herrmann R. G. und Maier R. M., 2002. The plastid chromosome of *Atropa belladonna* and its comparison with that of *Nicotiana tabacum*: the role of RNA editing in generating divergence in the process of plant speciation. *Mol Biol Evol* 19, 1602-1612.
- Schmitz-Linneweber C., Tillich M., Herrmann R. G. und Maier R. M., 2001. Heterologous, splicing-dependent RNA editing in chloroplasts: allotetraploidy provides *trans*-factors. *EMBO J* 20, 4874-4883.
- Schmitz-Linneweber C., Tillich M., Poltnigg P. und Maier R. M., 2003. A role for plastid RNA editing in reproductive isolation of plant species. 1, Pandalai S. G., ed. (Kerala, India, Research Signpost).
- Shields D. C. und Wolfe K. H., 1997. Accelerated evolution of sites undergoing mRNA editing in plant mitochondria and chloroplasts. *Mol Biol Evol* 14, 344-349.

- Shikanai T., Endo T., Hashimoto T., Yamada Y., Asada K. und Yokota A., 1998. Directed disruption of the tobacco *ndhB* gene impairs cyclic electron flow around photosystem I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9705-9709.
- Shinozaki K., Ohme M., Tanaka M., Wakasugi T., Hayashida N., Matsubayashi T., Zaita N., Chunwongse J., Obokata J., Yamaguchi-Shinozaki K., *et al.*, 1986. The complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J* 5, 2043-2049.
- Silhavy D. und Maliga P., 1998. Mapping of promoters for the nucleus-encoded plastid RNA polymerase (NEP) in the iojap maize mutant. *Curr Genet* 33, 340-344.
- Small I. D. und Peeters N., 2000. The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci* 25, 46-47.
- Southern E. M., 1975. Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517.
- Spurr A. R., 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 26, 31-43.
- Steele J. A., Uchytel T. F., Durbin R. D., Bhatnagar P. und Rich D. H., 1976. Chloroplast coupling factor 1: A species-specific receptor for tentoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 2245-2248.
- Stegemann S., Hartmann S., Ruf S. und Bock R., 2003. High-frequency gene transfer from the chloroplast genome to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Steinhauser S., Beckert S., Capesius I., Malek O. und Knoop V., 1999. Plant mitochondrial RNA editing. *J Mol Evol* 48, 303-312.
- Stoebe B. und Kowallik K. V., 1999. Gene-cluster analysis in chloroplast genomics. *Trends Genet* 15, 344-347.
- Stubbe W., 1959. Genetische Analyse des Zusammenwirkens von Genom und Plastom bei *Oenothera*. *Z Vererbungsl* 90, 288-298.
- Stubbe W., 1963. Extrem disharmonische Genom-Plastom-Kombinationen und väterliche Plastidenvererbung bei *Oenothera*. *Z Vererbungsl* 94, 392-411.
- Stubbe W., 1989. *Oenothera* - an ideal system for studying the interactions of genome and plastome. *Plant Mol Biol Rep* 7, 245-257.
- Sugiura M., 1992. The chloroplast genome. *Plant Mol Biol* 19, 149-168.
- Sugiura M., 1995. The chloroplast genome. *Essays Biochem* 30, 49-57.
- Sun Q., Emanuelsson O. und van Wijk K. J., 2004. Analysis of curated and predicted plastid subproteomes of *Arabidopsis*. Subcellular compartmentalization leads to distinctive proteome properties. *Plant Physiol* 135, 723-734.
- Sundberg E., Slagter J. G., Fridborg I., Cleary S. P., Robinson C. und Coupland G., 1997. ALBINO3, an *Arabidopsis* nuclear gene essential for chloroplast differentiation, encodes a chloroplast protein that shows homology to proteins present in bacterial membranes and yeast mitochondria. *Plant Cell* 9, 717-730.
- Surzycki S. J. und Shellenbarger D. L., 1976. Purification and characterization of a putative sigma factor from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 3961-3965.
- Svab Z., Hajdukiewicz P. und Maliga P., 1990. Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8526-8530.
- Svab Z. und Maliga P., 1986. *Nicotiana tabacum* mutants with chloroplast encoded streptomycin resistance and pigment deficiency. *Theor Appl Genet* 72, 637-643.
- Svab Z. und Maliga P., 1993. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 913-917.

- Till B., Schmitz-Linneweber C., Williams-Carrier R. und Barkan A., 2001. CRS1 is a novel group II intron splicing factor that was derived from a domain of ancient origin. *RNA* 7, 1227-1238.
- Tillich M., Funk H. T., Schmitz-Linneweber C., Poltnigg P., Sabater B., Martin M. und Maier R. M., 2005. Editing of plastid RNA in *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Plant J* 43, 708-715.
- Tillich M., Lehwark P., Morton B. R. und Maier U. G., 2006a. The Evolution of Chloroplast RNA Editing. *Mol Biol Evol* 23, 1912-1921.
- Tillich M., Poltnigg P., Kushnir S. und Schmitz-Linneweber C., 2006b. Maintenance of plastid RNA editing activities independently of their target sites. *EMBO Rep* 7, 308-313.
- Tillich M., Schmitz-Linneweber C., Herrmann R. G. und Maier R. M., 2001. The plastid chromosome of maize (*Zea mays*): Update of the complete sequence and transcript editing sites. *Maize Genet Corp News Letters* 75, 42-44.
- Ting C. T., Tsaur S. C., Wu M. L. und Wu C. I., 1998. A rapidly evolving homeobox at the site of a hybrid sterility gene. *Science* 282, 1501-1504.
- Tucker W. C., Du Z., Gromet-Elhanan Z. und Richter M. L., 2001. Formation and properties of hybrid photosynthetic F1-ATPases. Demonstration of different structural requirements for stimulation and inhibition by tentoxin. *Eur J Biochem* 268, 2179-2186.
- Tucker W. C., Du Z., Hein R., Richter M. L. und Gromet-Elhanan Z., 2000. Hybrid *Rhodospirillum rubrum* F(0)F(1) ATP synthases containing spinach chloroplast F(1) beta or alpha and beta subunits reveal the essential role of the alpha subunit in ATP synthesis and tentoxin sensitivity. *J Biol Chem* 275, 906-912.
- Vermel M., Guermann B., Delage L., Grienemberger J. M., Marechal-Drouard L. und Gualberto J. M., 2002. A family of RRM-type RNA-binding proteins specific to plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5866-5871.
- Wakasugi T., Hirose T., Horiata M., Tsudzuki T., Kössel H. und Sugiura M., 1996. Creation of a novel protein-coding region at the RNA level in black pine chloroplasts: the pattern of RNA editing in the gymnosperm chloroplast is different from that in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 8766-8770.
- Weber J. und Senior A. E., 2003. ATP synthesis driven by proton transport in F1F0-ATP synthase. *FEBS Lett* 545, 61-70.
- Whitney S. M., von Caemmerer S., Hudson G. S. und Andrews T. J., 1999. Directed mutation of the Rubisco large subunit of tobacco influences photorespiration and growth. *Plant Physiol* 121, 579-588.
- Williams P. M. und Barkan A., 2003. A chloroplast-localized PPR protein required for plastid ribosome accumulation. *Plant J* 36, 675-686.
- Wittbrodt J., Adam D., Malitschek B., Maueler W., Raulf F., Telling A., Robertson S. M. und Scharl M., 1989. Novel putative receptor tyrosine kinase encoded by the melanoma-inducing Tu locus in *Xiphophorus*. *Nature* 341, 415-421.
- Wolf P. G., Rowe C. A. und Hasebe M., 2004. High levels of RNA editing in a vascular plant chloroplast genome: analysis of transcripts from the fern *Adiantum capillus-veneris*. *Gene* 339, 89-97.
- Wollman F. A., Kuras R. und Choquet Y., 1995. Epistatic effects in thylakoid protein synthesis: the example of cytochrome *f*., Mathis P., ed. (Dordrecht, Kluwer Academic Publishers).
- Yao J. L. und Cohen D., 2000. Multiple gene control of plastome-genome incompatibility and plastid DNA inheritance in interspecific hybrids of *Zantedeschia*. *Theor Appl Genet* 101, 400-406.

- Yao J. L., Cohen D. und Rowland R. E., 1994. Plastid DNA inheritance and plastome-genome incompatibility in interspecific hybrids of *Zantedeschia* (Araceae). 88, 255 - 260.
- Yesodi V., Izhar S., Hauschner H., Tabib Y. und Firon N., 1997. Homologous recombination involving *cox2* is responsible for a mutation in the cmS-specific mitochondrial locus of *Petunia*. Mol Gen Genet 255, 106-114.
- Yu W. und Schuster W., 1995. Evidence for a site-specific cytidine deamination reaction involved in C to U RNA editing of plant mitochondria. J Biol Chem 270, 18227-18233.
- Yukawa M., Tsudzuki T. und Sugiura M., 2006. The chloroplast genome of *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tomentosiformis*: complete sequencing confirms that the *Nicotiana sylvestris* progenitor is the maternal genome donor of *Nicotiana tabacum*. Mol Genet Genomics 275, 367-373.
- Zanduetta-Criado A. und Bock R., 2004. Surprising features of plastid *ndhD* transcripts: addition of non-encoded nucleotides and polysome association of mRNAs with an unedited start codon. Nucleic Acids Res 32, 542-550.
- Zeltz P., Hess W. R., Neckermann K., Borner T. und Kossel H., 1993. Editing of the chloroplast *rpoB* transcript is independent of chloroplast translation and shows different patterns in barley and maize. EMBO J 12, 4291-4296.
- Zerges W., 2000. Translation in chloroplasts. Biochimie 82, 583-601.
- Zito F., Kuras R., Choquet Y., Kossel H. und Wollman F. A., 1997. Mutations of cytochrome b6 in *Chlamydomonas reinhardtii* disclose the functional significance for a proline to leucine conversion by *petB* editing in maize and tobacco. Plant Mol Biol 33, 79-86.
- Zubko M. K. und Day A., 2002. Differential regulation of genes transcribed by nucleus-encoded plastid RNA polymerase, and DNA amplification, within ribosome-deficient plastids in stable phenocopies of cereal albino mutants. Mol Genet Genomics 267, 27-37.
- Zubko M. K., Zubko E. I., Ruban A. V., Adler K., Mock H. P., Misera S., Gleba Y. Y. und Grimm B., 2001. Extensive developmental and metabolic alterations in cybrids *Nicotiana tabacum* (+ *Hyoscyamus niger*) are caused by complex nucleo-cytoplasmic incompatibility. Plant J 25, 627-639.

Danksagung

Leider kann ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rainer M. Maier nicht mehr bedanken. Er hat mir wie kein anderer Spaß an der Wissenschaft vermittelt und ohne ihn hätte ich diese Arbeit nicht begonnen. Schade, dass Du nicht mehr Zeit hattest, Rainer.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Uwe G. Maier, der nach dem Tod von Rainer Maier bedingungslos die Verantwortung für meine Arbeit übernommen hat und ohne dessen Hilfe eine Weiterführung meiner Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Mitverantwortlich für die erfolgreiche Weiterführung war ebenso die DFG, die die finanzielle Unterstützung innerhalb des Sonderforschungsbereichs TR-1 für die laufende Förderperiode nicht einstellte, sowie der Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg mit der Bereitstellung der Räumlichkeiten und finanzieller Unterstützung.

Des weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Klaus Lingelbach für die Übernahme der Zweitbegutachtung sowie Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl und Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer als weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission.

Ohne die Vorarbeiten, die Motivation und die ständige Hilfsbereitschaft von Prof. Dr. Christian Schmitz-Linneweber sowie seinen Korrekturarbeiten zu meiner Dissertation wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Weiter maßgeblich beteiligt an dieser Arbeit waren Dr. Sergei Kushnir mit der Herstellung der Cybriden sowie Sabine Kemp mit der riesigen Hilfe bei der Herstellung der Tabakmutanten.

Ein Dank an Michi Tillich (DAM DAM.....DAM) für die beste Laboratmosphäre, die man sich vorstellen kann – auch wenn sie teuer erkaufte war, z.B. mit Stiften, Scheren.....sowie Danke an die anderen Laborbewohner von oben: Lucette, Heidemarie, Ingrid, Patrick, Maritha, Felix, Julia, Herrn Dr. Müller sowie Herrn Prof. Dr. Werner.

Von den Keller-Maiers gilt mein Dank im Besonderen Dr. Stefan Zauner für's Korrekturlesen und die ein oder andere Problemlösung. Auch vielen Dank an Frau Zimmermann für die Chlamy-Anzucht und Oli, Maik, Sven, Christine, Kathrin, Franziska, Lars, Marcel, Conny, Andrew, Olaf, Petra und Marianne für alle offenen Ohren für Labor- oder allgemeine Marburg-Problemchen.....sollte ich jemanden vergessen oder falsch geschrieben haben, habe ich mit der Namensliste wohl zu viel riskiert – sorry.

Auch von den Münchnern bin ich einigen zu großem Dank verpflichtet: Theresa Neuner für alles, was mit dem SFB TR-1 zu tun hatte; Ingrid Duschaneck für unzählige Sequenzierungen; Martina Reymers für viele viele Tipps zur Gewebekultur; Moni Wimmer für die Hiwi-Hilfe im Thripsensommer 2003, Irmi Reiber für die Pflege und Kreuzung vieler Tabakpflanzen; Claudia Nickel für die Unterstützung bei Westerns und Julia Legen als Universallexikon für alle Laborprobleme.

Stephanie Kastner danke ich dafür, dass in der letzten Version meiner Dissertation viel mehr Buchstaben an der richtigen Stelle stehen, als es ohne ihre Hilfe der Fall gewesen wäre.

Ein großes Dankeschön an Helena für alle Hilfen, vor allem aber für ihre Geduld mit mir, trotz meiner nicht immer besten Laune.....

Mein herzlichster Dank geht an meine Eltern für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

Lebenslauf

Peter Poltnigg
Wilhelmstr. 66
35037 Marburg

Email: peter.poltnigg@gmx.de

Persönliche Daten

Geburtstag und -ort: 18.04.1975 in Augsburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung

1986 - 1995 Gymnasium Wertingen
Abschluss: Abitur

Zivildienst

08/1995 - 08/1996 Mobiler sozialer Hilfs- und Pflegedienst, Sozialstation
Dinkelscherben-Zusmarshausen-Welden e. V.

Akademische Ausbildung

10/1996 - 09/2002 Studium der Biologie
an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Hauptfach: Genetik
Nebenfächer: Biochemie, Zoologie/Zellbiologie,
physiologische Botanik
Thema der Diplomarbeit: Evolutionäre Fluktuation plasti-
därer Edierungsstellen und nukleärer Edierungsfaktoren
innerhalb der Gattungen *Nicotiana* und *Oenothera*
Betreuer: PD Dr. Rainer M. Maier
Abschluss: Diplom

10/2002 - 02/2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Ludwig-Maximilians-
Universität München in der Arbeitsgruppe von PD Dr.
Rainer M. Maier

ab 03/2003 Promotion; Titel der Dissertation: RNA Edierung als
molekulare Ursache für Kerngenom-Plastom-
Inkompatibilität

Gastaufenthalt an auswärtigen Instituten

11/2005 Kurzaufenthalt an der Universidad Alcalá de Henares,
Departamento de Biología Vegetal, Spanien
Koordinierung gemeinsamer Forschungsprojekte (gefördert
durch den DAAD)

Mitgliedschaften

Mitglied der „International Society of Endocytobiology“ (ISE)
seit 2003

Publikationsliste

Publikationen

Tillich M, Poltnigg P, Kushnir S, Schmitz-Linneweber C. Maintenance of plastid RNA editing activities independently of their target sites. EMBO Rep. 2006 Mar; 7(3):308-13 (geteilte Erstautorenschaft)

Tillich M, Funk HT, Schmitz-Linneweber C, Poltnigg P, Sabater B, Martin M, Maier RM. Editing of plastid RNA in *Arabidopsis thaliana* ecotypes. Plant J. 2005 Sep; 43(5):708-15

Schmitz-Linneweber C, Kushnir S, Babiychuk E, Poltnigg P, Herrmann RG, Maier RM. Pigment deficiency in nightshade/tobacco cybrids is caused by the failure to edit the plastid ATPase alpha-subunit mRNA. Plant Cell. 2005 Jun; 17(6):1815-28

Funk HT, Poltnigg P, Schmitz-Linneweber C, Tillich M. Transcript polishing in higher plant plastids by RNA editing. Endocytobiosis Cell Res. 2004, 15(2), 491-503

Schmitz-Linneweber C, Tillich M, Poltnigg P, Maier RM. A role of plastid RNA editing in reproductive isolation of plant species. Res. Devel. Plant Mol. Biol. 2003, 1, ISBN: 81-271-0009-9

Beiträge auf wissenschaftlichen Konferenzen

Poster: A role for RNA editing in plant speciation. FEBS Advanced Course on the Origin and Evolution of Mitochondria and Chloroplasts. Wildbad Kreuth, 2005

Vortrag: Evolutionary and Mechanistic Aspects of Plastid RNA Editing. RNA Biochemistry & Workshop 'Riboswitches'. Blaubeuren, 2004

Vortrag: Loss of plastid mRNA editing leads to nucleo/organelle incompatibility. 9th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis. Jena, 2004

Vortrag: Molekulare Mechanismen der Kern/Plastom-(In)Kompatibilität am Beispiel von Atropa/Tabak-Cybriden und Oenothera-Artbastarden. 17. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen. Dabringhausen, 2004

Poster: RNA editing in plant organelles: Evolution and impact on plant speciation. FEBS Advanced Course on the Origin and Evolution of Mitochondria and Chloroplasts. Hvar, Croatia, 2003

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „RNA Edierung als molekulare Ursache für Kerngenom-Plastom-Inkompatibilität“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, der 18.09.2006

Peter Poltnigg